



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL SUSTENTÁVEL**

**CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL
SUSTENTÁVEL**

MICHELI BECKER

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
EXTRATOS DE PLANTAS NO CULTIVO INTENSIVO DE ALEVINOS DE TILÁPIA
Oreochromis niloticus NA FASE DE JUVENIL**

LARANJEIRAS DO SUL

2018

MICHELI BECKER

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
EXTRATOS DE PLANTAS NO CULTIVO INTENSIVO DE ALEVINOS DE
TILÁPIA *Oreochromis niloticus* NA FASE DE JUVENIL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável sob a orientação da Prof^a. Dra. Luisa Helena Cazarolli e Coorientação da Prof^a. Dra. Silvia Romão.

Laranjeiras do Sul -PR

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Campus Laranjeiras do Sul-PR

Rodovia BR 158 - Km 405

CEP 85301-970

Telefone: (42) 3635-0000

Laranjeiras do Sul - PR

Brasil

B395a Becker, Micheli

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial antibacteriano de extratos de plantas no cultivo intensivo de alevinos de tilápia *Oreochromis niloticus* na fase de juvenil / Micheli Becker. – 2018.

108 f. : il.

Orientadora: Luisa Helena Cazarolli

Co-orientadora: Silvia Romão

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável – PPGADR, Laranjeiras do Sul, PR, 2018.

1. Agroecologia. 2. Piscicultura. 3. Bacteriologia. 4. Agentes antimicrobianos. I. Cazarolli, Luisa Helena, orient. II. Romão, Silvia, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título

CDD 639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Bibliotecas - UFFS

Franciele Scaglioni da Cruz

CRB-14/1585

MICHELI BECKER

TÍTULO: "Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial antibacteriano de extratos de plantas no cultivo intensivo de tilápia *Oreochromis niloticus* na fase juvenil".

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* - Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável – PPGADR da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de Mestra em **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, defendido em 04/07/2018.

Presidente da Banca: Dr^a. Luisa Helena Cazarolli

Aprovado em: 04 / 07 / 2018

BANCA EXAMINADORA



Dr^a. Luisa Helena Cazarolli/UFFS



Dr. Jorge Erick Garcia Parra/UFFS



Dr^a. Silvia Romão/UFFS



Dr^a. Amanda Keller Siqueira/UFFS

Laranjeiras do Sul/PR, julho de 2018

Dedico a todos que lutam por uma
sociedade mais justa e humana.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela sua paciência e amor comigo.

Agradeço em especial a minha família que sempre me apoiou em todos os momentos.

Agradeço a minha Orientadora Luisa pela paciência e dedicação com o meu trabalho e comigo, pela parceria em cada passo do desenvolvimento desse trabalho, e por dividir sua atenção comigo neste momento tão especial da sua vida, a maternidade.

Agradeço a minha Co-orientadora Silvia pela dedicação ao meu experimento e aos muitos ensinamentos.

Agradeço ao Dr. Luciano pela parceria, na coleta e preparo dos extratos.

Agradeço a Mestre Vanessa pela solicitude em todos os momentos de necessidade, durante a construção desse trabalho e pelos sábios conselhos.

Agradeço aos meus colaboradores dos Laboratórios de Bioquímica e Genética, vocês são fundamentais para a construção desse trabalho, obrigada pela dedicação com que ajudaram na construção do meu trabalho, como se fosse de vocês, nunca esquecerei de cada um de vocês.

Agradeço a minha turma, terceira turma do mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, pelo apoio incondicional, e o ombro amigo.

Agradeço especialmente a Juliana, Jaqueline, Chaline, Marciane e Giovana por me aguentarem nesse período de mestrado e sempre estares juntas de mim.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho. Especialmente a Dionata Sandeski, Roby Wilyas, Henrique Bondrani e a Maria Alice.

Agradeço a todos da comunidade do GOU nossa Senhora de Pentecostes, pela amizade e fortaleza durante todo esse mestrado.

Obrigada!!

"Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá em grupo."

Provérbio Africano

RESUMO

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas ao descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas, dentre as quais há registro de atividade antibacteriana dos extratos de goiabeira (*Psidium guajava*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), alho (*Allium sativum*), eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e pinus (*Pinus elliottii*). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano de extratos das plantas (goiabeira, erva-mate, alho, eucalipto e pinus) *in vitro*, onde os extratos das plantas foram testados frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* (CPQBA228-08) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC12386) responsáveis por doenças bacterianas em pisciculturas de água doce; e posteriormente *in vivo*. No estudo *in vitro*, constatou-se que a bactéria *S. agalactiae* é resistente a todos os extratos testados. Por outro lado, a bactéria *A. hydrophila* demonstrou-se sensível ao extrato de erva-mate. O desafio *in vivo* avaliou o extrato de erva-mate como antimicrobiano frente à *A. hydrophila* (CPQBA228-08) em infecção experimental sobre a espécie *Oreochromis niloticus* na fase de juvenil. Foi realizada a suplementação da ração com erva-mate na alimentação de *O. niloticus* e ao final do período de suplementação de 25 dias os animais foram desafiados com *A. hydrophila*. Foram avaliados os seguintes parâmetros: sistema imune (atividade de Lisozima e conteúdo de Nitrito/Nitrato) sistema antioxidante (CAT, GST, GSH, LPO e PC), análises hematológicas (eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, VCM, CHCM, HCM), parâmetros metabólicos (AST, ALT, glicemia e conteúdo de glicogênio) além dos parâmetros zootécnicos (taxa de crescimento específico (TCE%), fator de condição (FC), ganho em peso (GP) e taxa de sobrevivência (TS%)). No período também foi avaliada a qualidade de água do sistema. A partir dos resultados obtidos, a suplementação com erva-mate e o desafio com *A. hydrophila* não influenciaram a qualidade de água e os parâmetros de crescimento. Em relação à atividade do sistema imune foi observado um aumento do conteúdo de nitrito/nitrato renal nos grupos não desafiados T1(0,005%). Não foram observadas alterações significantes do sistema antioxidante apesar de um aumento pontual de GSH no grupo T2 (0,05%) não desafiado. A suplementação não influenciou na atividade plasmática de AST e ALT, indicando ausência de efeito tóxico hepático e também não promoveu alterações no conteúdo de glicogênio hepático. Por outro lado, foi observado um aumento das concentrações de glicose sanguínea nas menores concentrações T1 e T2 de erva-mate dos grupos desafiados com *A. hydrophila*. Em relação às variáveis hematológicas, verificou-se uma redução do número de eritrócitos, caracterizando anemia, podendo estar associada à infecção bacteriana. Os resultados encontrados *in vitro* indicam potencial antibacteriano do extrato de erva-mate, porém não foram verificados efeitos que indiquem aumento de resistência à infecção bacteriana no experimento *in vivo*. É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho utilizando a erva-mate como potencial agente terapêutico antibacteriano em aquicultura. Frente a isso é necessário realizar estudos considerando maiores tempos e doses de suplementação bem como diferentes fases de desenvolvimento dos animais.

Palavras-chave: Ervas medicinais. *Ilex paraguariensis*. Erva-mate. Metabolismo. Piscicultura. Biocontrole. *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT

Several investigations have been developed and directed to the discovery of new antimicrobial agents from plant extracts, among which there are records of antibacterial activity of guava extracts (*Psidium guajava*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*), garlic (*Allium sativum*) eucalyptus (*Eucalyptus sp.*) and pinus (*Pinus elliottii*). The objective of this study was to evaluate the antibacterial potential of plant extracts (guava, herb-mate, garlic, eucalyptus and pinus) *in vitro*, in which plant extracts were tested against *Aeromonas hydrophila* (CPQBA228-08) and *Streptococcus agalactiae* (ATCC12386) responsible for bacterial diseases in freshwater fish farms; and subsequently *in vivo*. In the *in vitro* study, it was verified that *S. agalactiae* is resistant to all the extracts tested. On the other hand, the bacterium *A. hydrophila* was sensitive to the yerba mate extract. The *in vivo* challenge evaluated the antimicrobial herb antimatter extract against *A. hydrophila* (CPQBA228-08) in experimental infection on the *Oreochromis niloticus* species in the juvenile phase. Feed supplementation was carried out with yerba mate in the feed of *O. niloticus* and at the end of the supplementation period of 25 days the animals were challenged with *A. hydrophila*. Antioxidant system (CAT, GST, GSH, LPO and PC), hematological tests (erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, VCM, CHCM, HCM) were analyzed. The parameters were: immune system (Lysozyme activity and Nitrite content / metabolic variables (AST, ALT, glycemia and glycogen content) as well as the zootechnical parameters (specific growth rate (TCE%), condition factor (FC), weight gain (GP) and survival rate (TS%). In the period the water quality of the system was also evaluated. From the results obtained, the supplementation with yerba mate and the challenge with *A. hydrophila* did not influence the quality of water and the parameters of growth. Regarding the activity of the immune system, an increase in renal nitrite / nitrate content was observed in the non-challenged groups T1 (0.005%). There were no significant alterations of the antioxidant system despite a non-challenged T2-weighted increase of GSH in the T2 group (0.05%). Supplementation did not influence the plasma activity of AST and ALT, indicating absence of hepatic toxic effect and also did not promote alterations in hepatic glycogen content. On the other hand, an increase in blood glucose concentrations was observed in the lower concentrations T1 and T2 of mate-grass in the groups challenged with *A. hydrophila*. Regarding the hematological variables, there was a reduction in the number of erythrocytes, characterizing anemia, and may be associated with bacterial infection. The results found *in vitro* indicate the antibacterial potential of the yerba mate extract, but no effects were observed to indicate resistance to bacterial infection in the *in vivo* experiment. It is important to emphasize that this is the first work using yerba mate as a potential antibacterial therapeutic agent in aquaculture. In view of this it is necessary to carry out studies considering longer times and doses of supplementation as well as different stages of development of the animals.

Keywords: Medicinal plants. *Ilex paraguariensis*. Yerba mate. Metabolism. Pisciculture. Biocontrol. *Aeromonas hydrophila*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema representativo da resposta imune do peixe frente ao ataque por patógenos..... | 21 |
| Figura 2. Redução unieletrônica do oxigênio à água. | 29 |
| Figura 3. Ilustração do sistema antioxidante e danos oxidativos. | 33 |
| Figura 4. Bulbo de <i>Allium sativum</i> L..... | 37 |
| Figura 5. Estrutura reprodutiva do Eucalipto (<i>Eucalyptus</i> sp.), B) Árvore de <i>Eucalyptus</i> sp..... | 38 |
| Figura 6. A) Estrutura reprodutiva da <i>Ilex paraguariensis</i> . B) Árvore nativa da coleta. C) Cultivo comercial de <i>Ilex paraguariensis</i> | 39 |
| Figura 7. A) Estrutura reprodutiva de <i>Pinus elliottii</i> , B) Árvore de <i>Pinus elliottii</i> | 40 |
| Figura 8. A) Frutos de <i>Psidium guajava</i> L. B) Árvore de <i>Psidium guajava</i> L. | 41 |
| Figura 9. Fluxograma do preparo dos extratos de goiabeira, erva mate, eucalipto, pinus e alho. | 45 |
| Figura 10. A) Foto do sistema de recirculação B) esquema do sistema de recirculação. | 48 |
| Figura 11. Fluxograma do experimento com suplementação de erva-mate na ração para <i>O. niloticus</i> | 52 |
| Figura 12. Fluxograma geral da metodologia in vivo. | 57 |
| Figura 13. MIC para <i>A. hydrophila</i> (CPQBA 228-08). Microplaca com os extratos de (A) erva-mate, (B) goiabeira, (C) pinus, (D) alho, (E) eucalipto em diferentes concentrações (mg/mL) após 24 horas de incubação com a bactéria <i>A. hydrophila</i> (CPQBA 228-08)..... | 58 |
| Figura 14. (A) Atividade da enzima AST (U.L ⁻¹), (B) Atividade da enzima ALT (U.L ⁻¹) no plasma de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 66 |
| Figura 15. (A) Níveis de glicemia (mg.dL ⁻¹) e (B) conteúdo de glicogênio (mg de glicogênio.g de tecido hepático ⁻¹) de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 68 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Concentração de glutathiona reduzida total (GSH) em mM.mL ⁻¹ no fígado de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate..... | 70 |
| Figura 17. Atividade da enzima Glutathiona S-Transferase (GST) em mM ⁻¹ min ⁻¹ mg proteína ⁻¹ no fígado de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 72 |
| Figura 18. Atividade da enzima Catalase (CAT) em mmol.min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹ no fígado de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 73 |
| Figura 19. A) Determinação da Lipoperoxidação - LPO em mmol de TBARS ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹ e B) Determinação da Proteína Carbonilada - PC em μmol ⁻¹ . mg de proteína ⁻¹ no fígado de <i>O.niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 74 |
| Figura 20. Conteúdo de Nitrito/Nitrato em μM no rim de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 76 |
| Figura 21. A) Atividade da Lisozima em μg/mL no plasma; B) Atividade da enzima Lisozima em μg/mL no rim de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate..... | 78 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e seus locais de ação..... | 31 |
| Tabela 2. Exemplo de espécies vegetais contendo substâncias químicas com atividade antibacteriana..... | 37 |
| Tabela 3. Antibiógrama com halos de inibição (em mm) para os extratos de erva-mate, goiabeira, pinus, alho, eucalipto em diferentes concentrações após incubação com a bactéria <i>A. hydrophila</i> (CPQBA 228-08). | 59 |
| Tabela 4. Antibiógrama com halos de inibição (em mm) para os extratos de erva-mate, goiabeira, pinus, alho, eucalipto em diferentes concentrações após incubação com a bactéria <i>S. agalactiae</i> (ATCC 12386). | 60 |
| Tabela 5 Parâmetros da qualidade da água do experimento, após suplementação de ração cm diferentes concentrações de erva mate, em juvenis de tilápia desafiados ou não com a <i>Aeromonas hydrophila</i> | 63 |
| Tabela 6. Parâmetros zootécnicos de <i>O. niloticus</i> desafiado com <i>A. hydrophila</i> tratadas com suplementação da ração em diferentes concentrações de erva-mate. | 65 |
| Tabela 7. Parâmetros hematológicos do sangue de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 82 |
| Tabela 8. Atividade das enzimas AST em U/L, e ALT em U/L no plasma de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate | 101 |
| Tabela 9. Glicemia em mg/dL e reserva de Glicogênio em mg de glicogênio/g de tecido hepático de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 101 |
| Tabela 10. Concentração de glutathiona reduzida total -GSH, em mM/ml no fígado de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 102 |
| Tabela 11 Atividades das enzimas Glutathione S-Transferase (GST) em mM ⁻¹ min ⁻¹ mg proteína ⁻¹ e Catalase (CAT) (mmol min ⁻¹ mg de proteína ⁻¹) no fígado de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 102 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 12. Proteína Carbonilada -PC (μmol^{-1} . mg de proteína ⁻¹) e Lipoperoxidação - LPO (mmol TBARS ⁻¹ .mg proteína ⁻¹) no fígado de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 103 |
| Tabela 13. Concentração de Nitrito/Nitrato em μM no rim de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 103 |
| Tabela 14. Atividade da enzima Lisozima plasmática em $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e atividade da enzima Lisozima renal em $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de <i>O. niloticus</i> suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. | 104 |

LISTA DE SIGLAS

ALT: Alanina-Aminotransferase

AST: Aspartatoamino-Transferase

ATCC 12386: American Type Culture Collection

BHT: Hidroxitolueno Butilado

CAT: Catalase

CDC: Centro de controle e prevenção de doenças

DV: Desvio Padrão

ERNS: Espécies Reativas de Nitrogênio

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

FC: Fator de Condição

GP: Ganho de Peso

LPO: Lipoperoxidação

MIC: Concentração Inibitória Mínima

SOD: Superóxido Dismutase

TCA: Ácido Tricloroacético

TCE: Taxa de Crescimento Específico

Gift: Genetic improvement of farmed tilapias

GR: Glutathione Redutase

GST: Glutathione S-Transferase

GSH: Glutathione Reduzida

Gssg: Glutathione Oxidada

NADH: Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Reduzido

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

ONOO-: Peroxinitrito

PBS: Tampão Fosfato-Salino

TGP: Transaminase Glutâmico-Pirúvica

TGO: Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 17 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:..... | 17 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 18 |
| 3.1. Aquicultura e tilápia | 18 |
| 3.2. Sistema imune e metabólico dos peixes | 20 |
| 3.3. Doenças Bacterianas em peixes | 33 |
| 3.4. Plantas medicinais e o uso na aquicultura | 36 |
| 4. METODOLOGIA..... | 43 |
| 4.1. Plantas utilizadas e coleta do material vegetal | 43 |
| 4.2. Preparo dos extratos | 43 |
| 4.3. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> | 46 |
| 4.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) | 46 |
| 4.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana | 46 |
| 4.4. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> | 47 |
| 4.4.1 Instalações | 47 |
| 4.4.2 Condições gerais de aclimação e manutenção dos animais durante os experimentos | 50 |
| 4.4.3 Protocolo experimental | 51 |
| 4.4.4 Coleta de amostras | 52 |
| 4.4.5 Análises Bioquímicas | 53 |
| 4.4.6 Análises Hematológicas | 56 |
| 4.4.7 Análise estatística | 57 |

| | |
|---|------------|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| 5.1 Experimentos <i>in vitro</i> | 58 |
| 5.1.1. MIC | 58 |
| 5.1.2. Antibiograma..... | 59 |
| 5.2 Ensaio <i>in vivo</i> | 61 |
| 5.2.1. Parâmetros de qualidade de água e zootécnicos..... | 62 |
| 5.2.2. Análises metabólicas | 66 |
| 5.2.3. Sistema imune e hematológico..... | 76 |
| 6.CONCLUSÕES..... | 83 |
| 7. REFERÊNCIAS | 84 |
| 8. ANEXO I | 101 |
| TABELAS | 101 |

1. INTRODUÇÃO

A demanda por proteína animal, em especial por pescados, vem crescendo de forma expressiva nas últimas décadas no Brasil e no mundo em decorrência do aumento populacional e da busca por alimentos mais saudáveis (FAO, 2014). Diante das limitações de expansão da pesca, a aquicultura torna-se uma alternativa importante para suprir essa demanda e vem ampliando bastante sua participação no total de produção de pescados no mundo. O Brasil apresenta grande potencial produtivo no setor da aquicultura principalmente devido às condições naturais existentes como a abundância de recursos hídricos, o clima predominantemente tropical e a diversidade de espécies com potencial para o cultivo (BRASIL, 2011). Dentre as espécies mais utilizadas nos sistemas comerciais de cultivo destaca-se a tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*).

A tilápia do nilo (*O. niloticus*) é um peixe de escama, pertencente a Ordem Perciforme, e à família Cichidae, com um mercado estabelecido e consolidado, formando o segundo maior grupo de espécies cultivadas em todo mundo, perdendo apenas para as carpas. A tilápia na sua alimentação apresenta boa aceitação de alimentos compostos por de proteína de origem vegetal, são resistentes ao manejo, toleram altas biomassas e baixos níveis de oxigênio dissolvido na água abaixo de 3 podendo chegar a 1 (mg.L⁻¹). Possuem bom desempenho produtivo alcançando de 600 a 800 g entre 4 e 6 meses de cultivo. Os alevinos são produzidos durante todo o ano e nos sistemas de produção os machos crescem mais que as fêmeas, por causa do gasto energético das fêmeas para reprodução (KUBITZA, 2006; SANTOS, et al., 2015). Apresentam um mercado consumidor promissor e uma cadeia de produção bem estabelecida em todos os níveis, iniciando com o fornecimento de insumos, rações balanceadas para cada fase do seu desenvolvimento, como também animais com qualidade genética (OLIVEIRA, et al., 2012; RESENDE, 2010).

Proporcionalmente ao crescimento da demanda por pescado que ocorre em nível mundial, vem crescendo a produção de pescado de forma intensiva e juntamente com essa forma de produção vem aumentando a incidência de doenças nas pisciculturas provocadas por agentes patogênicos diversos. Dentre as principais causas para essa disseminação de doenças está o aumento da carga de matéria orgânica empregada no cultivo, as altas

biomassas utilizadas, o estresse ambiental principalmente atrelado a temperatura e qualidade da água. Na piscicultura, dentre as enfermidades que vêm aumentando muito nas últimas décadas são destaque aquelas causadas por bactérias, tornando-se um dos principais entraves para a produção de peixes de forma intensiva (PAVANELLI, 2008).

Dentre as diversas bactérias descritas na literatura como causadoras de doenças na piscicultura de água doce, algumas espécies merecem destaque pela elevada incidência e/ou mortalidade dos animais acometidos dentre elas estão, *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*, gerando prejuízos econômicos e ambientais, sendo que ambas as bactérias são associadas a ulcerações no tegumento do animal (ALTINOK, et al., 2016; AL-HARBI, 2016).

A espécie *A. hydrophila* é considerada a principal bactéria oportunista causadora de doenças em peixes de água doce levando a altos índices de mortalidade nos sistemas de cultivo comercial (NOGA, 1996; FIGUEIREDO, 2008). É uma bactéria que se encontra amplamente distribuída no meio aquático, tanto na água quanto em substratos, além de habitar a microfauna intestinal dos animais (SCHROERS, et al., 2009). Ainda, a *A. hydrophila* atua como patógeno secundário, só apresentando patogenicidade quando o organismo aquático se encontra exposto à estresse ou à um patógeno primário (PAVANELLI, 2008).

A espécie *S. agalactiae* é a bactéria responsável por infecções no sistema nervoso dos peixes e dos seres humanos (BERRIDGE et al., 2001). Sendo responsáveis por infecções em peixes de água doce e salgada, gerando intensa mortalidade, e consequentemente impactos negativos economicamente (FIOLO et al., 2012; FIGUEIREDO et al. 2006). Sendo relatado que os surtos de *S. agalactiae*, apresentam maior mortalidade no início da infecção (SALVADOR et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2006).

Visando a superação desse entrave na piscicultura utiliza-se atualmente no tratamento das doenças bacterianas os mesmos antimicrobianos que são utilizados no tratamento de doenças bacterianas em humanos uma vez que não existem medicamentos específicos para peixes. Este sistema de tratamento empregado nos animais acaba gerando um grande risco de geração de resistência bacteriana, além de deixarem resíduos no ambiente e cujas consequências são desconhecidas na grande maioria das vezes (GASTALHO, DA SILVA, RAMOS, 2014). Rodgers, Furones, (2009) em consonância com o estudo de Love et al., (2011) buscaram identificar as consequências do uso

indiscriminado de antibióticos na aquicultura, verificando que existe uma negligência com relação a regulamentação do uso de antibióticos, sendo regulamentado somente na União Europeia.

Buscando amenizar os efeitos negativos da produção intensiva, a Agroecologia vem como uma nova ciência, que no campo da sua complexidade visa propor novas formas de compreender e tratar os efeitos colaterais da produção, buscando analisar o fenômeno de estudo, neste caso as doenças bacterianas na piscicultura, de forma holística e entender como esse fenômeno interfere no meio em que está inserido. Ainda, analisar de forma sistêmica as maneiras de interferir nesse problema e suas consequências. A aplicação dos conceitos agroecológicos na aquicultura busca sempre atingir a sustentabilidade do sistema de produção e reduzir as externalidades negativas do sistema (GLIESSMAN, 1998; ALTIERI, 2004; CAPORAL, 2009).

Diante deste cenário, vem sendo observado um incremento no interesse e na busca por alternativas ao uso dos antimicrobianos na piscicultura, sejam essas alternativas como profiláticas ou terapêuticas frente às doenças de etiologia bacteriana. Dentre as fontes alternativas que vêm sendo estudadas estão as plantas e compostos derivados de extratos de plantas (CASTRO, 2008). Diversos compostos derivados de plantas têm sido empregados na prevenção e tratamento de enfermidades em peixes uma vez que as plantas apresentam diversas propriedades biológicas, entre elas antibacteriana (MULYANINGSIH, et al., 2010; NYA, DAWOOD, AUSTIN, 2010; MARTIN, et al., 2013).

No entanto, embora haja evidências dos benefícios do uso do extrato de plantas na aquicultura, existem poucos estudos sobre os efeitos destes extratos na Tilápia do Nilo. Além disso, a grande suscetibilidade da Tilápia a bacterioses, principalmente relacionadas a condições estressantes e perda da resistência imunológica, fazem com que o tratamento com extratos de plantas seja uma alternativa potencialmente viável, com menor dano ao meio ambiente e com baixo custo, para minimizar as perdas na produção. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar plantas com efeito antibacteriano *in vitro* e avaliar sua eficácia e segurança para uso *in vivo* em juvenis de tilápia do nilo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana de extratos de plantas *in vitro* e posteriormente *in vivo* durante a fase de juvenil de *Oreochromis niloticus* expostos à infecção experimental.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Verificar o potencial antibacteriano *in vitro* de extratos das plantas goiabeira (*Psidium guajava* L.), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), alho (*Allium sativum*), eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e pinus (*Pinus elliottii*) frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.
- b) Determinar a concentração mais efetiva em termos de atividade antibacteriana *in vitro*, dos extratos das plantas (goiabeira, erva mate, alho, eucalipto e pinus).
- c) Avaliar o efeito antibacteriano do extrato da planta com melhor atividade antibacteriana *in vitro*, em experimento com tilápia na fase de juvenil *in vivo*.
- d) Avaliar os efeitos do tratamento com extrato da planta com melhor desempenho *in vitro* sobre parâmetros hematológicos e imunes de juvenis de tilápia.
- e) Estudar os efeitos do tratamento com extrato de planta sobre parâmetros bioquímicos e antioxidantes do sangue e fígado de juvenis de tilápia.
- f) Avaliar os efeitos do tratamento com extrato de planta sobre parâmetros de crescimento (taxa de crescimento específico (TCE%), fator de condição (FC), ganho em peso (GP) e taxa de sobrevivência (TS%)) de juvenis de tilápia.
- g) Avaliar os efeitos do tratamento com extrato de planta sobre parâmetros da qualidade de água no sistema de recirculação.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Aquicultura e tilápia

A aquicultura consiste da criação de organismos aquáticos com parte do seu ciclo de vida na água e com valor comercial como peixes, moluscos, crustáceos e plantas. Neste contexto, os peixes são, de longe, a principal classe de organismos produzidos por esta atividade e, de fato, a produção de peixes na aquicultura ultrapassa a coleta através da pesca. A piscicultura é uma atividade que vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteína para o consumo humano, sendo uma das atividades que mais tem crescido em todo o mundo (FAO, 2010; QUEIROZ, et al., 2005). O Brasil apresenta grande potencial produtivo na piscicultura principalmente devido às condições naturais existentes e a diversidade de espécies com potencial para o cultivo.

Dentro do setor agropecuário no Estado do Paraná, a piscicultura é considerada por De Andrade, (2005) uma alternativa importante de produção para a pequena propriedade. Segundo a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural EMATER-PR (2005), cerca de 22 mil produtores dedicam-se à atividade, produzindo cerca de 18 mil t.ano⁻¹. Esses números colocaram a piscicultura paranaense entre os três maiores produtores nacionais em 2001 (MARTINS et al., 2001). Em 2015 o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), apresentou dados da produção nacional de tilápia, com um aumento de 9,7% em relação a 2014. Segundo estes dados, o Paraná assumiu a segunda posição, com 69,3 mil toneladas, um aumento de 20,8% em relação a 2014 (IBGE, 2016).

Segundo a FAO (2016) a piscicultura mundial em 2014 atingiu 49,8 milhões de toneladas de peixes e, uma das espécies de peixes de água doce mais cultivadas no mundo, é a tilápia (*Oreochromis niloticus*). De acordo com dados da FAO, (2012), a produção desta espécie de peixe em 2011 foi de aproximadamente 3.000.000 de toneladas. Existem mais de 70 espécies de tilápias identificadas e distribuídas em 4 gêneros: *Oreochromis*, onde as fêmeas realizam a incubação oral dos ovos e oferecem proteção à prole, o gênero *Sarotherodon* onde o macho ou o casal realizam a incubação oral dos ovos e apresentam

cuidado parental, o gênero *Tilapia* que desova em substrato e não apresentam incubação oral, nem cuidado parental (KUBITZA, 2011), e por último o gênero *Danakilia*, somente encontrada nos lagos salinos do deserto da Etiópia, que apresenta a incubação oral dos ovos e cuidado parental (DUNZ, SCHLIEWEN, 2013). Dentre esses gêneros descritos somente *Oreochromis* apresenta viabilidade para a aquicultura mundial, em virtude dos índices de produtividade e adaptação a condições de cativeiro. As principais espécies cultivadas são: *Oreochromis niloticus* (tilápia do nilo), *Oreochromis mossambicus* (tilápia de Moçambique), *Oreochromis aureus* (tilápia áurea ou azul) e *Oreochromis urolepishornorum* (tilápia Zanzibar). A tilápia do nilo é conhecida em virtude do crescimento rápido, o que promoveu a difusão do cultivo para vários países do mundo (VIDAL et al., 2015).

A tilápia é originária do continente africano sendo cultivada no mundo todo devido às suas características zootécnicas, pois apresenta rápido crescimento, grande rusticidade, fácil manejo, alto índice de rendimento de carcaça e carne de ótima qualidade (CONTE, 2002; JU, CHEN, LIAO et al., 2014; LI et al., 2013). São peixes tolerantes à altas densidades de estocagem sendo cultivados em regime intensivo, tanto em viveiros escavados como tanques rede ou gaiolas (KUBITZA, 2011).

Na natureza, as tilápias apresentam hábito alimentar micrófago filtrador, porém no cultivo intensivo é tratada como onívora, com disponibilidade diferentes formulações de ração no mercado, de acordo com cada fase do seu desenvolvimento, proporcionando um melhor crescimento e rendimento de carcaça (Kubitza, 2011).

A Tilápia é um peixe tropical, apresentando sua faixa ideal de temperatura para desenvolvimento entre 27 e 31 °C. Assim, temperaturas acima de 32 °C e abaixo de 27°C reduzem o apetite e o crescimento alterando a taxa metabólica, e abaixo de 18 °C o sistema imunológico é suprimido (MACHADO et al., 2010). Além disso, já estão bem padronizadas as condições ideais sobre as variáveis de qualidade de água para a Tilápia, sendo temperatura entre 27 e 31 °C, o nível de oxigênio dissolvido (OD) acima de 2~3 mg.L⁻¹, pH entre 6,0 e 7,0 e níveis de amônia não-ionizada inferiores a 0,08 mg.L⁻¹ (ZIMMERMANN, FITZSIMMONS, 2004). Estas características fazem com que esta espécie seja considerada boa para o cultivo na região central do Paraná, no período de verão. Pois durante o inverno as tilápias têm seu crescimento interrompido, por não se alimentarem devido a temperatura da água abaixo de 20 °C (ZIMMERMANN, FITZSIMMONS, 2004).

O cultivo da tilápia pode ser realizado de diversas maneiras e entre as diferentes formas de cultivo destaca-se o sistema intensivo. O sistema intensivo de cultivo é caracterizado por fatores de produção controlados pelo homem como elevada densidade populacional de peixes por volume d'água, alimentação artificial exclusivamente à base de rações balanceadas, necessidade de alto fluxo de água ou uma recirculação forçada por causa da alta densidade populacional. Este sistema apresenta custo elevado de implantação e manutenção, demandando mão-de-obra especializada e altos níveis de mecanização e tecnologia (MOREIRA et al., 2001). Durante o cultivo esses animais são mantidos em alta densidade de estocagem, somado ao manejo inerente aos sistemas intensivos de produção (manipulação, reprodução artificial, transporte, biometrias), que causam supressão do sistema imunológico, tornando o organismo cultivado mais propenso e susceptível a patógenos, devido ao estresse causado pelo sistema de cultivo (PAVANELLI, 2008).

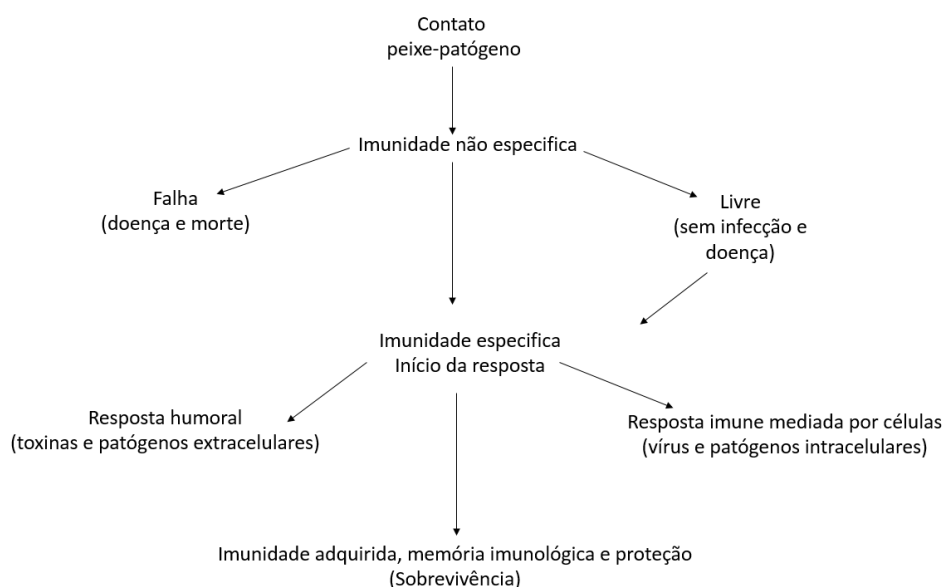
No sistema intensivo de cultivo as práticas de manejo mais estressantes são a biometria e o transporte dos animais, onde o manuseio excessivo dos peixes leva à perda de muco e danos na superfície corporal, deixando o animal susceptível à invasão bacteriana (HARVEY, HOAR, 1979). Outro fator que interfere no nível de estresse é a variação das condições ambientais, como a temperatura, o excesso de matéria orgânica na água, oxigênio dissolvido abaixo das concentrações adequadas e alta densidade populacional, tornando os animais mais suscetíveis a enfermidades, em especial àquelas causadas por bactérias oportunistas (WOO, BRUNO, 1998).

3.2. Sistema imune e metabólico dos peixes

A resposta imune dos peixes é bastante semelhante à dos vertebrados superiores. A resposta imune pode ser dividida em dois tipos: resposta inata ou não específica, que consiste em impedir que os agentes patogênicos tenham acesso ao organismo hospedeiro, ou seja, eficácia em prevenir a infecção inicial e/ou combater o agente patogênico após a infecção iniciada. Para isso podem liberar substâncias que eliminem o patógeno como o muco e a lisozima denominadas de barreiras químicas, ou agir bloqueando a entrada dos patógenos, através de barreiras físicas como as brânquias, tegumento e escamas. Outra parte da barreira química são as enzimas e proteínas do sistema complemento, que atuam

em parceria com as células de defesa fagocíticas inespecíficas (TORT et al., 2003; ABREU, 2007; TIZARD, 2008). Ativando a resposta imune específica que é caracterizada pela especificidade e memória imunológica, é induzida por substâncias denominadas imunógenos (BERNSTEIN et al., 1998) (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo da resposta imune do peixe frente ao ataque por patógenos.



Fonte: adaptado de Shoemaker, Klesius, Lim, (2001).

As células que atuam no sistema imune são principalmente os leucócitos, incluindo linfócitos, monócitos/macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas. Macrófagos e granulócitos são considerados células fagocíticas móveis, encontradas no sangue e nos tecidos linfoides secundários, sendo especialmente importantes em situações de inflamação, onde a resposta celular frente à invasão microbiana ou injúria tecidual leva à migração de leucócitos para o local (SECOMBES, 1996).

Durante a resposta imune quando as barreiras físicas são ultrapassadas pelos patógenos, o processo de fagocitose realizado pelas células de defesa (leucócitos) torna-se extremamente importante. A fagocitose consiste no englobamento dos patógenos pelos

leucócitos, tanto no sangue quanto nos tecidos, e digestão dos microrganismos pela ação das enzimas hidrolíticas presentes nos fagossomos/vacúolos digestivos. Dentre as enzimas presentes, segundo Shoemaker et al., (2001), a lisozima desempenha função extremamente importante uma vez que catalisa a hidrólise das ligações $\beta(1-4)$ entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina dos peptídeoglicanos nas membranas das bactérias Gram-positivas e age sobre a parede externa das bactérias Gram-negativas.

Segundo Sveinbjornsson, Olsen, (1996) e Osserman, Lawlor, (1966) nos peixes a lisozima está presente em macrófagos, neutrófilos e células granulosas eosinofílicas na pele, epiderme e intestino (SVEINBJORNSSON, OLSEN, 1996; OSSERMAN, LAWLOR, 1966). No salmão o gene da lisozima é transcrito em vários órgãos principalmente no rim, seguido do baço, fígado e intestino. A maior atividade de transcrição do gene da lisozima é identificada na parte anterior do rim, sendo este órgão um dos principais órgãos hematopoiéticos nos peixes, responsável pela formação, desenvolvimento e maturação das células do sangue, entre elas os macrófagos (PAULSEN et al., 2003).

A atividade da lisozima, assim como de outros componentes do sistema imune de peixes, também sofre influência de fatores externos como estação do ano, sexo e estágio de maturação sexual (FLETCHER, et al., 1976). Porém, deve-se destacar que a temperatura da água e a condição de estresse, seja ela por manejo ou poluição, influenciam de maneira significativa, diminuindo a concentração de lisozima no plasma (MOCK, PETERS, 1990).

Além da ação das enzimas lisossomais como a lisozima, a destruição dos antígenos nos vacúolos digestivos durante a fagocitose envolve a explosão respiratória (SILVA, 2017). A explosão respiratória consiste no aumento do consumo de oxigênio, produção de espécies reativas e ataque ao antígeno terminando com a destruição do mesmo. Nesse momento o óxido nítrico (NO) é produzido, sendo considerado um dos principais mediadores citotóxicos de células imunes ativadas e sendo produzido em quantidades significativas durante o processo de fagocitose e na resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune, que expressam a isoforma da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). O NO como radical livre reage com o ânion superóxido e forma peroxinitrito um potente oxidante que pode destruir os microrganismos invasores, tornando-se assim um fator importante na resposta imune dos peixes (MARTINS et al., 2009).

O NO gerado nestas circunstâncias é liberado dos macrófagos e atua sobre as células ou microrganismos alvo ocasionando danos oxidativos letais (SECOMBES, 1996; NATHAN; HIBBS, 1991). Em presença de oxigênio e oxihemoglobina este radical é rapidamente degradado (meia-vida extremamente curta, de 4 a 6 segundos no plasma) produzindo nitrito (NO^{2-}) e nitrato (NO^{3-}) que são utilizados como marcadores para a determinação da produção de NO e da resposta imune (ASL, GHASEMI, AZIZI, 2008).

Durante os processos infecciosos, as células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) resulta na formação de peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$), um poderoso oxidante de proteínas (DUSSE, VIEIRA, CARVALHO, 2003). O peroxinitrito pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio (H^+), originando um radical altamente reativo e tóxico, o radical hidroxil (OH^{\cdot}), aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do $\text{O}_2^{\cdot-}$ (MARLETTA et al., 1998). A célula produtora de NO e sua vizinhança não estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas. O NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais (DUSSE, VIEIRA, CARVALHO, 2003).

Além da atuação do óxido nítrico no sistema de defesa imune dos organismos onde atua como bactericida, parasiticida e viricida (DRAPIER, WEIZESBIN, HIBBS, 1988; LOWENSTEIN et al., 1996), o óxido nítrico também atua como importante sinalizador de processos biológicos em diversas condições fisiológicas como neurotransmissão e regulação da pressão arterial, sendo abundante no organismo (VALKO et al., 2007). Além disso, o NO atua como mensageiro celular em menores concentrações (IMRAN, 2018; FLORA FILHO, ZILBERSTEIN, 2000).

Durante as respostas de defesa frente a agentes estranhos, além da resposta imune não específica, a resposta imune específica contribui sobremaneira para a defesa dos organismos. A resposta imune específica atuando reconhecimento do agente invasor, culminando na formação de anticorpos e memória imunológica. A imunidade específica refere-se à proteção que existe num organismo hospedeiro quando este sofreu prévia exposição a determinados agentes e pode ser mediada por anticorpos (imunidade humoral) ou por células (imunidade celular) (SECOMBES, 1996).

Na imunidade celular ocorre o envolvimento das células apresentadoras de antígeno (CAA) e dos linfócitos T que têm a capacidade para reconhecer alguns antígenos que se ligam a marcadores de superfície das CAA. A exposição e ligação de linfócitos T com o antígeno específico estimulam sua proliferação (TIZARD, 2008). Já na imunidade humoral, segundo Secombes, (1996), quando um antígeno entra num organismo e chega a um órgão linfóide, estimula os linfócitos B que possuem na membrana receptores específicos para esse antígeno. Como resposta, os linfócitos B dividem-se e formam células que sofrem diferenciação, originando plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória. Os plasmócitos produzem anticorpos específicos para cada antígeno. Os anticorpos são posteriormente lançados no sangue e vão ao local da infecção. As células de memória ficam inativas, mas prontas a responder rapidamente, caso venha a acontecer posterior contato com o antígeno.

Segundo Iwama, Nakanishi, (1996), fatores celulares e humorais de ambos os sistemas, específico e não específico, promovem nos peixes proteção externa e interna contra agentes infecciosos. Apesar da distinção na classificação desses dois sistemas de defesa, deve-se entender que sempre que um agente patogênico ataca o organismo, este se defende mediante a interação da maioria dos elementos que compõem o sistema imune, onde vários fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação (FERNANDEZ et al., 2002).

Segundo William, Swanson, (2006) no início do desenvolvimento embrionário as células recebem seus nutrientes por difusão, mas com a multiplicação contínua das células isso deixa de ser viável e ocorre a formação de um sistema de distribuição e transporte, sendo responsável pelo transporte de nutrientes e dos materiais residuais resultante do metabolismo celular. Este sistema de distribuição é denominado de sistema cardiovascular, sendo o meio de transporte o sangue. O sangue é composto por células circulantes com variadas funções, além de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas comuns a todo o corpo, sendo que essas substâncias químicas ficam suspensas e/ou dissolvidas em água. Nós peixes teleósteos segundo relatos de Tavares-Dias et al. (2009) e Ranzani-Paiva et al., (2013) o sistema hematológico é composto pelo tecido fluido (sangue) com função de distribuir calor, transportar os gases respiratórios, nutrientes, hormônios e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo.

Segundo William, Swanson, (2006) identifica-se três classes de células sanguíneas. Os eritrócitos possuem função de transporte O_2 e CO_2 na circulação, sendo as células mais numerosas no sangue. Os trombóticos atuam na coagulação sanguínea evitando extravasamento celular durante danos físicos (RANZANI-PAIVA et al., 2013), sendo conhecidos em mamíferos como plaquetas (WILLIAM, SWNSON, 2006). Os leucócitos ou glóbulos brancos que desempenham função de células de defesa (RANZANI-PAIVA et al., 2013), sendo constituídos por linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (TAVARES-DIAS, MORAES, 2004).

A partir dos valores de referência para uma determinada espécie, de número de eritrócitos, leucócitos e trombóticos é possível monitorar alterações destes valores sob condições controladas (RANZANI-PAIVA, SILVA-SOUZA, 2004). Os animais estão susceptíveis à mudanças ambientais e/ou do manejo, sendo que essas mudanças refletem diretamente nos valores dos índices hematológicos dos animais. O acompanhamento desses índices hematológicos auxilia na compreensão do processo de adaptação dos animais frente ao ambiente e/ou ao manejo (RANZANI-PAIVA et al., 2005).

O sistema hematológico de peixes é composto pelos mesmos órgãos que atuam no sistema imune como o rim, baço e o timo. Na maioria dos teleósteos, a porção frontal do rim é responsável pela hematopoiese (processo de formação, desenvolvimento e maturação as células do sangue), enquanto a caudal restringe-se à osmorregulação. A porção anterior do rim tem uma grande similaridade com a medula óssea, estrutura que em vertebrados superiores possui tanto a função linfohematopoiética como também de diferenciação de linfócitos B. Dessa forma, no rim anterior (pro-néfrons) são produzidos anticorpos (FANGE, NILSSON, 1985). Já o baço, concentra a filtração de antígenos, hemocaterese (processo pelo qual as hemácias e demais elementos envelhecidos do sangue são eliminados da circulação) e estocagem de eritrócitos (KLOSTERHOFF, 2012; ZAPATA, CHIBA, VARAS, 1996). E por último o timo, que em peixes teleósteos apresenta similaridade estrutural e funcional com o de mamíferos. Nos peixes, o timo permanece intimamente associado com a câmara branquial no epitélio da faringe formando sua borda anterior, sendo o órgão fundamental para diferenciação e maturação da linhagem linfóide T, que dá origem aos linfócitos T (ZAPATA, CHIBA, VARAS, 1996).

Klosterhoff, (2012) ao analisar o desenvolvimento do rim, timo e baço do bijupirá (*Rachycentron canadum*), identificou que partir dos primeiros estágios larvais ocorre o rápido desenvolvimento dos órgãos do sistema imunológico e hematológico, sendo que ocorre o surgimento do rim anterior no primeiro dia após a eclosão, do baço no quinto dia após a eclosão e do timo no sétimo dia após a eclosão.

Além do funcionamento adequado dos sistemas imune e hematológico, a condição metabólica e nutricional é um fator importante na resistência a patógenos e na resposta imune dos animais. Considerando o comportamento metabólico, o conjunto de enzimas relacionadas ao metabolismo de açúcares, gorduras e proteínas nos peixes é bastante distinto e as respostas à mudanças na dieta ou no ambiente podem ser extremamente variáveis dentre as inúmeras espécies de peixes (SEIXAS-FILHO, 2004; NELSON, COX, 2014).

A principal fonte de energia para os peixes teleósteos é o metabolismo proteico, que possui três fontes de aminoácidos (aa) sendo elas, a via dietética, a quebra de proteína corporal e a biossíntese de aa não essenciais. A análise da distribuição dos aa em peixe gato (*Ictalurus punctatus*) revelaram que o fígado e o rim apresentam maior concentração de aa. A composição de aa livres varia de acordo com a composição proteica da alimentação (JURS, BASTROP, 1995) e o padrão da composição de aa presentes no sangue e nos tecidos varia de acordo com o período com alimentação e jejum (JURS, BASTROP, 1995).

Após o transporte os aa são metabolizados ou usados para síntese de proteínas ou compostos nitrogenados nos órgãos periféricos do peixe. As duas principais reações no metabolismo dos aa são a transaminação que é uma reação caracterizada pela transferência de um grupo amino de um aminoácido para um cetoácido, e a desaminação oxidativa que é o processo pelo qual o aminoácido libera o seu grupo amino na forma de amônia e se transforma em um cetoácido. Estas reações são catalisadas pelas enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e glutamato desidrogenase (CAMPBELL, 2015).

Estas enzimas, em especial a ALT e AST, desempenham papel essencial atuando na síntese e degradação de aminoácidos. Suas atividades enzimáticas também são controladas por hormônios como insulina, glucagon, cortisol e adrenalina bem como pela disponibilidade de nutrientes. Essas enzimas apresentam ampla distribuição tecidual,

sendo a ALT encontrada em maiores concentrações no citosol das células hepáticas, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. Enquanto a AST está presente no citosol e mitocôndrias das células, estando em concentrações mais altas no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas (DÍAZ GONZÁLES, SILVA, 2006; NELSON, COX, 2014).

Além de atuarem na regulação do metabolismo de aminoácidos AST e ALT são marcadores de lesão ou toxicidade celular (NELSON, COX, 2014). Segundo Gomes, (2014) em caso de lesão aguda provocada por lesão ou toxicidade induzida por um composto, a atividade da AST é elevada no sangue, podendo ser mais de 10 vezes superior ao limite normal para *O. niloticus*, sendo este limite de 15 U/L a 30 U/L para AST e de 28 a 50 U/L para ALT, atingindo um pico nas primeiras 24 horas após o evento, e regressando a valores normais até 7 dias após o mesmo. As espécies reativas de oxigênio geradas no processo de estresse oxidativo afetariam a permeabilidade do hepatócito através do dano celular, resultando no fluxo das transaminases do fígado (ALT e AST) para o sangue (SRIVASTAVA et al., 2004; ABDEL-TAWWAB et al., 2017). Segundo Sparling et al., (1998), as enzimas aminotransferases em peixes são usadas como bioindicadores de exposição a contaminantes ou drogas hepatotóxicas. O tecido hepático é o local com maior atividade das enzimas AST e ALT uma vez que é o principal órgão relacionado ao metabolismo, em especial ao metabolismo de proteínas, e a destoxificação de xenobióticos em peixes teleósteos.

Além das proteínas, outra fonte de energia para os peixes é o metabolismo de carboidratos. O metabolismo de carboidratos é regulado por ação hormonal, sendo a insulina e o glucagon os dois principais hormônios regulatórios (NELSON, COX, 2014). Na presença de insulina, os tecidos são estimulados a utilizar a glicose como fonte de energia e armazená-la na forma de glicogênio. Na presença de glucagon o organismo é direcionado à ativação das vias de gliconeogênese e glicogenólise para a quebra das reservas de glicogênio e a manutenção das concentrações de glicose sanguínea (NELSON, COX, 2014).

Mesmo com dificuldade de acesso a fontes de carboidratos no ambiente aquático, os peixes possuem uma boa reserva de carboidrato armazenado na forma de glicogênio, principalmente no fígado, essa reserva é responsável por manter os níveis de glicose sanguínea, sendo acionada em resposta a situações de estresse prolongado. Além do

fígado, os peixes também apresentam reserva de glicogênio no músculo, sendo essa fundamental para suprir demandas imediatas de energia desencadeadas por situações estressantes que requeiram fuga (THOMAS, MOON, FOSTER, 1995).

Em situações estressantes há um aumento na concentração de cortisol e adrenalina plasmáticos estimulando a gliconeogênese que consiste na síntese de glicose a partir de lactato, aminoácidos livres e glicerol (NELSON, COX, 2014). Quando o peixe é exposto a uma situação de estresse, seja químico, físico ou biológico, ocorre a liberação destes hormônios no sangue estimulando os tecidos a liberar maior quantidade de glicose para a corrente sanguínea em especial o fígado (gerando hiperglicemia), preparando o animal para uma resposta de defesa (TAVARES-DIAS, MARTINS, MORAES, 2001; URBINATI, CARNEIRO, 2004; BARCELLOS et al., 2001). Logo, as concentrações de glicose plasmática e o conteúdo de glicogênio tecidual são considerados bons marcadores do sistema metabólico bem como do estado de estresse em peixes teleósteos (BARCELLOS et al., 2001; Mc ELROY et al., 2015).

De maneira geral, todos os organismos vivos, em especial os peixes, sempre buscam a homeostase corporal, com os sistemas metabólico, hematológico e imune funcionando em harmonia protegendo os peixes de estresses ambientais e injúrias externas e permitindo respostas e crescimento adequados. Porém, quando ocorre o estresse por fatores ambientais ou de manejo o peixe sai desse estado de homeostase alterando sua capacidade de defesa, momento esse em que podem se instalar enfermidades, principalmente as provocadas por bactérias oportunistas (TIZARD, 2008; DOTTA, 2013).

Além do sistema imune e metabólico, outra forma de proteção da homeostase celular dos peixes é o sistema de defesa antioxidante, que age neutralizando os produtos do estresse oxidativo. O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas e radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gerando um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (GUTTERIDGE, 1993; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000).

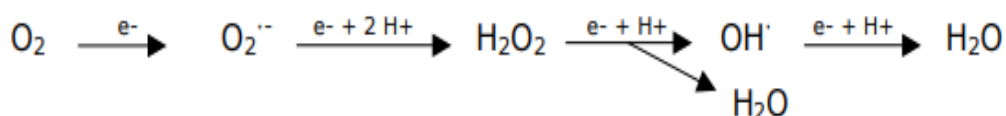
Define-se como espécie reativa toda molécula altamente reativa, com elétrons desemparelhados (radical livre) ou não, que apresenta elevada instabilidade. As principais

espécies reativas são derivadas do metabolismo do oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERNs) nos organismos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000; DAMASCENO et al., 2002). O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, a molécula de oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO) (FLORES, 2000).

Dentre as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), a principal delas é o óxido nítrico (NO), um radical livre abundante no organismo que atua como importante molécula de sinalização em vários processos biológicos, como neurotransmissão, relaxamento de musculatura lisa e regulação da pressão arterial e de mecanismos de defesa (VALKO et al., 2007). Entretanto, em condições patológicas, ocorre a reação do (NO) com o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), uma molécula altamente reativa, que pode reagir com grupamentos de proteínas, lipídios ou ácido desoxirribonucleico (DNA) (PACHER, BECKMAN, LIAUDET, 2007).

Já as principais fontes endógenas geradoras de espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem as mitocôndrias e a atividade de algumas enzimas como as envolvidas na via de produção de prostaglandinas e tromboxanos, além da enzima NADPH oxidase da membrana plasmática de macrófagos, que produzem uma grande quantidade de EROs em resposta a patógenos (ROVER JÚNIOR, HOEHR, VELLASCO, 2001). O processo de formação de EROs na mitocôndria consiste principalmente da redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de quatro elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento de moléculas instáveis como o peróxido de hidrogênio, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}) intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular (ROVER JÚNIOR, HOEHR, VELLASCO, 2001) como demonstrado na figura 2.

Figura 2. Redução unieletrônica do oxigênio à água.



Fonte: Garcez et al. (2004).

Os principais (EROs) segundo Ferreira, Matsubara, (1997) incluem: radical superóxido($O_2^{\bullet -}$) formado após a primeira redução do O_2 e o radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}). O radical superóxido($O_2^{\bullet -}$) ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária decorrentes da sua produção. O radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}) é a forma protonada do radical superóxido, constituído por próton hidrogênio. Existem evidências de que o radical hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990).

O radical hidroxil (OH^{\bullet}) pode ser considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos, pois apresenta rápida combinação com os metais ou outros radicais no próprio local onde é produzido. A presença do radical hidroxil acarreta riscos quando sua produção se dá próxima ao DNA, pois se a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o radical hidroxil pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular) ao oxidar seus grupos sulfidrilas ($-SH$) a pontes dissulfeto ($-SS$). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1986). Já o peróxido de hidrogênio H_2O_2 , não considerado um radical livre pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, mas sim uma espécie altamente instável, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa da reação que produz o radical hidroxil (OH^{\bullet}). H_2O_2 tem meia-vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao íon ferro(Fe^{++}). Sendo que a sua toxicidade é aumentada quando em presença de ferro (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; DUNNILL et al., 2017). Além das espécies reativas já citadas, o oxigênio singlete (1O_2) que é a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, é uma ERO altamente instável e tem importância em certos eventos biológicos, como na defesa contra a infecção (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; DUNNILL et al., 2017).

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e seus locais de ação.

| Espécies | Estrutura Química | Descrição | Ocorrência | Ação |
|-------------------------------|-------------------|---|--|---|
| Radical superóxido | $O_2^{\bullet -}$ | Radical mais importante na indução de dano celular | Aproximadamente em todas as células aeróbicas | Na maioria das reações atua como agente redutor |
| Radical hidroxila | HO^{\bullet} | Altamente reativo | Formado a partir da homólise da água | DNA, proteínas, carboidratos e lipídios |
| Radical hidroperóxido | HO_2^{\bullet} | Protonado a partir do $O_2^{\bullet -}$ | Através do peróxido de hidrogênio | Membrana biológica |
| Peróxido de hidrogênio | H_2O_2 | Não é um radical livre | Reação para produção de HO^{\bullet} | Proteínas e lipídios |
| Oxigênio singleto | 1O_2 | Não é um radical. É uma molécula de oxigênio excitada | Produzidos pelos fagócitos, indução luminosa e reações catalisadas pelas peroxidases | Mutação no DNA |

Fonte: Adaptado de Garcez et al., (2004).

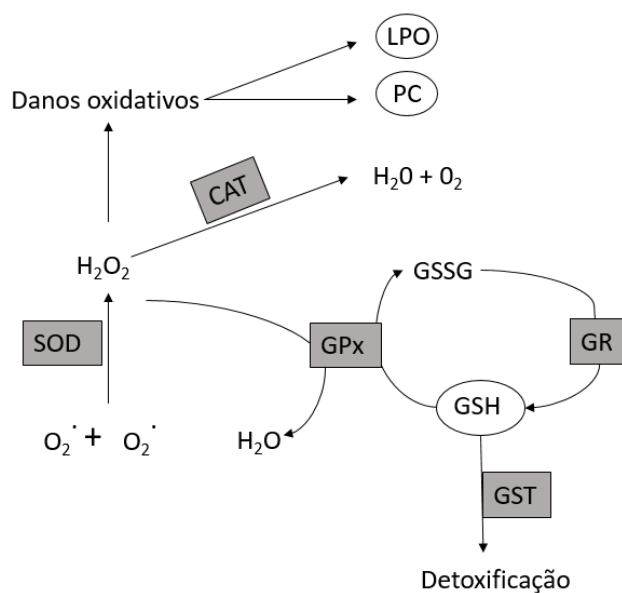
Estas espécies reativas de oxigênio (EROS) para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando esta última uma espécie também radicalar e a consequência disto é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, do DNA, e das proteínas (ROVER JÚNIOR, HOEHR, VELLASCO, 2001). Portanto, a toxicidade do oxigênio, em praticamente todas as células aeróbicas, decorre da formação de EROs, além da formação de ERNs (espécies reativas de nitrogênio), que podem interagir com diversas biomoléculas, com o objetivo de se estabilizarem lesando diferentes estruturas celulares (ROVER JÚNIOR, HOEHR, VELLASCO, 20001).

Para proteger as células dos danos provocados pelas espécies reativas, os organismos dispõem de um complexo sistema de defesa. As defesas antioxidantes dos organismos podem ser divididas em dois grupos, enzimáticas e não enzimáticas. O sistema enzimático envolve as enzimas do ciclo redox da glutathione, a glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione s-transferase (GST) (BARREIROS et al., 2006). Além destas, a superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio e a catalase que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água constituem as principais enzimas antioxidantes dos sistemas biológicos (BABIOR, 1997).

A proteção antioxidante não enzimática é feita por moléculas endógenas e exógenas, naturais ou sintéticas, que protegem alvos biológicos da oxidação por apresentarem uma das três propriedades: supressão da formação de radicais livres, eliminação de radicais livres ou ainda desativação, formando um produto estável e participação em processos de reparo (RIBEIRO et al., 2005).

Dentre as moléculas mais conhecidas destacam-se a glutathiona, as vitaminas E (α -tocoferol) e C (ácido L-ascórbico). A Glutathiona é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) e existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo que sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. Atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER, ANDERSON, 1983). A vitamina E é uma molécula lipossolúvel e tende a se concentrar no interior das membranas, agindo sinergicamente com o ascorbato (MEISTER, ANDERSON, 1983). É um potente removedor de radicais peróxila (LOO^{\bullet}) e provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação (retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos polinsaturados de membrana) (RIBEIRO et al., 2005). A vitamina C é considerada o mais potente antioxidante hidrossolúvel já que é um potente agente redutor, capaz de reduzir a maioria das EROs/ERNs como radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio singleto, além de ação como *scavenger* e também regeneradora de vitamina E. Como é hidrossolúvel possui maior ação no citosol das células e no plasma sanguíneo enquanto a vitamina E tem ação maior em membranas celulares por ser lipossolúvel (RIBEIRO et al., 2005). O sistema oxidante e dano oxidativo foi compilado na figura 3.

Figura 3. Ilustração do sistema antioxidante e danos oxidativos.



Fonte: Adaptado de Garcez et al., (2004).

3.3. Doenças Bacterianas em peixes

As bactérias oportunistas são conceituadas como bactérias que estão presentes no ambiente aquático continuamente, no entanto só expressão a virulência quando houver debilidade do sistema imune dos peixes (PAVANELLI, 2008). Segundo Dotta, (2013) a tilápia em sistema intensivo de cultivo fica exposta ao estresse causado pela variação da qualidade da água e práticas de manejo.

Segundo dados da literatura, causando enfermidades na espécie *O. niloticus* já foram identificados os gêneros de bactérias *Aeromonas* sp., responsável por graves infecções. *Yersinia* sp., responsável pela doença da boca vermelha; *Flavobacterium* sp. responsável pela doença branquial bacteriana, *Vibrio* sp. responsável pela doença do furúnculo também conhecida como peste vermelha; *Pasteurella* sp. que provoca a septicemia; *Staphylococcus* sp. que causa úlceras no corpo; *Micrococcus* sp. responsável por lesões no dorso; *Edwardsiella* sp. que apresenta como sinais clínicos lesões na pele e desenvolvimento de abscessos, *Actinobacter* sp. que age principalmente sobre os ovos destruindo os mesmos mas também é causadora de infecção no animal adulto (PAVANELLI, 2008). Apesar da identificação desses gêneros bacterianos em tilápia a bactéria responsável pelos principais surtos epizooticos e causadora de enfermidade na

piscicultura de água doce é *Aeromonas hydrophila* (PAVANELLI, 2008; IWASHITA et al., 2015; TELLEZ-BAÑUELOS, 2009).

O gênero *Aeromonas* apresenta ampla distribuição geográfica em ambientes aquáticos. Adaptadas ao crescimento em temperaturas que variam de 5 à 37 °C, essas bactérias são bastonetes Gram-negativos, oxidase positivos, anaeróbios facultativos e estão presentes na superfície e brânquias dos peixes (HATHA, VIVEKANANDHAN, JOICE, 2005; GUZ, KOZINSKA, 2004). *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas bestiarum* e *Aeromonas veronii* são as principais causadoras de doenças em peixes que em conjunto, são denominadas de "septicemia por *Aeromonas* móveis" (PAVANELLI, 2008). As bactérias citadas acima são chamadas de móveis pois apresentam motilidade por flagelos polares e laterais. Os sinais clínicos de infecção podem variar de lesões de pele, superficiais ou profundas, a quadros típicos de septicemia. As lesões de pele podem se apresentar como áreas de hemorragia e necrose de extensão variada, que podem progredir para úlceras que acometem geralmente o tecido muscular. Nos quadros de infecção sistêmica são observados a exoftalmia, abdômen distendido e presença de petéquias hemorrágicas nas vísceras (AUSTIN, AUSTIN 1987; PAVANELLI, EIRAS, TAKEMOTO, 2002).

Dentre as diversas espécies do gênero *Aeromonas*, *A. hydrophila* é a principal bactéria oportunista causadora de doenças em peixes de água doce. Estudos apontam que a *A. hydrophila* entra no corpo do peixe através das brânquias e tegumento lesionado (SHAO, XIANG 2004; CHU, ZHUANG, LU, 2008). Além disso, pelo fato de fazer parte da microfauna intestinal do peixe, esta bactéria pode invadir o tecido intestinal gerando destruição da camada de muco e reduzindo a resistência da mucosa intestinal a este patógeno (NEDOLUHA, WESTHOFF, 1993; SCHROERS et al., 2009).

Outro gênero importante causador de doenças em diversos hospedeiros, incluindo mamíferos e peixes é o gênero *Streptococcus* sp. que é composto por bactérias Gram-positivas. Dentre as bactérias desse gênero *S. agalactiae* é um patógeno de destaque, sendo responsável por infecções no sistema nervoso dos peixes e dos seres humanos (BERRIDGE et al., 2001). Fiolo et al., (2012) descrevem que os quadros de infecções nos seres humanos são caracterizados por septicemia, pneumonia e meningite, principalmente em recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos.

Figueiredo et al., (2006) atribuíram à bactéria *S. agalactiae* infecções causadas em peixes de água doce e salgada, responsável por intensa mortalidade, gerando

consequentes impactos econômicos negativos. Os sinais clínicos da infecção por *S. agalactiae* são natação errática, letargia, escurecimento, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade da córnea, áreas hemorrágicas ao redor dos olhos, brânquias e outras partes do corpo, ascite e ulceração (YANONG, FLOYD, 2006). Esses surtos são comuns na piscicultura e apresentam mortalidade maior no início da infecção (SALVADOR et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2006).

A eficiência do tratamento de doenças de origem bacteriana em peixes é bastante difícil de ser atingida e depende de diversos fatores envolvendo tanto características específicas das bactérias quanto dos animais acometidos e do ambiente de cultivo. Tradicionalmente, os antimicrobianos são a classe de medicamentos de escolha para a realização do tratamento das enfermidades bacterianas em geral. No entanto, seu uso apresenta alguns problemas como por exemplo, o fato de não haver antimicrobianos específicos para peixes e os que são utilizados na aquicultura serem os mesmos usados em humanos e outros animais. Além disso, os custos financeiros e a dificuldade em adaptar as concentrações de uso e os tempos de tratamento para os animais também representa um sério problema na terapêutica das doenças bacterianas. Em decorrência disto, há um aumento dos riscos de desenvolvimento de resistência bacteriana em função do mau uso dos fármacos bem como o acúmulo de resíduos na musculatura dos animais e ainda a contaminação pelos próprios antimicrobianos e/ou seus resíduos no meio ambiente (GASTALHO, DA SILVA, RAMOS, 2014).

Casos de resistência bacteriana em peixes foram diagnosticadas por Moore et al., (2014), no cultivo de Salmão (*Salmo salar*), onde encontrou os gêneros *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Chryseobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rheinheimera* sp., com resistência total ou parcial à antimicrobianos. Já Ozaktas, Taskin, Gozen (2012) em estudos com peixes de água doce (*Alburnus alburnus*) em ambiente natural (lago), identificaram as bactérias presentes no muco do tegumento do peixe e testaram quatro antibióticos, ampicilina, canamicina, estreptomicina e cloranfenicol, sendo que os gêneros que apresentaram algum nível de resistência foram *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Brevundimonas* sp., *Gordonia* sp., *Kocuria* sp., *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. e *Staphylococcus* sp.

Para Wright, (2010) a problemática gerada pela resistência bacteriana, teria como principal consequência tornar uma doença bacteriana que se encontrava total ou

parcialmente controlada em um problema de saúde pública. Um agravante desse fato é que bactérias causadoras de doenças em peixes também acometem seres humanos como a *S. agalactiae* e a *A. hydrophila*. No caso da bactéria *S. agalactiae*, a infecção pode ser causada por ingestão de pescado *in natura* (DESTRO, SERRANO, 1991). Já o mecanismo de infecção da *A. hydrophila* nos seres humanos ocorre através do contato de parte do corpo que apresente lesão com material de manejo como redes, baldes e/ou pulsas, que estejam contaminados. Neste caso a lesão servirá como porta de entrada para a bactéria (KONEMAN, 2001).

3.4. Plantas medicinais e o uso na aquicultura

Atualmente apresenta-se uma demanda por novas formas de tratamento das doenças bacterianas na piscicultura de forma eficaz e segura. Para isso, o desenvolvimento de formulações/princípios ativos que sejam próprios para doenças bacterianas que incidem sobre o cultivo e que representem/possuam menor risco de contaminação ambiental e para o ser humano, além de serem menos onerosos na criação é de extrema importância. Assim se faz necessário o estudo de novos compostos oriundos de fontes alternativas, sendo que as plantas representam uma fonte quase inesgotável para pesquisa e desenvolvimento (COWAN, 1999; GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

As fontes vegetais, em especial as plantas, são ricas em substâncias conhecidas como metabólitos secundários que desempenham diversas funções nos organismos vegetais como por exemplo a defesa e proteção da planta contra agentes agressores, atração de polinizadores, alelopatia dentre outras. Assim, despertam grande interesse não só pelas atividades biológicas exercidas nas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pelo imenso potencial de atividade farmacológica que possuem (SIMÕES et al., 2010). Recentemente, a utilização de plantas medicinais e/ou compostos naturais na aquicultura vem ganhando destaque em função do potencial de uso destas plantas na prevenção e/ou tratamento de enfermidades em peixes, em especial aquelas plantas com potencial antibacteriano (Tabela 2) (AMMER, 2016; FERNANDES, 2014; MARTIN, et al., 2013).

Tabela 2. Exemplo de espécies vegetais contendo substâncias químicas com atividade antibacteriana.

| Nome popular | Nome científico | Componente antimicrobiano |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Alho | <i>Allium sativum L.</i> | Alicina |
| Eucalipto | <i>Eucalyptus sp.</i> | Ácidos gálico |
| Erva-mate | <i>Ilex paraguariensis</i> | Ácidos gálico |
| Goiaba | <i>Psidium guajava L.</i> | Triterpenos, Flavonoides e Taninos |
| Pinus | <i>Pinus elliottii</i> | Fenólicos e Terpenóides |
| Hortelã | <i>Menthapiperita L.</i> | Mentol |
| Pimenta-da-jamaica | <i>Pimenta dióica</i> | Eugenol |
| Sálvia | <i>Salviaofficinalis</i> | Cis-tujona |
| Noz-moscada | <i>Myristicafragrans</i> | Isoeugenol. |
| Óleo de oliva | <i>Olea europeia L.</i> | Hexanal |
| Alecrim | <i>Rosmarinusofficinalis</i> | 1,8-cineol e cânfora |
| Cravo | <i>Sysygiumaromaticum</i> | Eugenol |

Fonte: Adaptado de Cowan, (1999); Bara, Vanetti, (1998); Pozzo et al., (2011).

Diversas plantas são descritas na literatura como potenciais fontes de compostos bioativos em função da composição química bastante complexa e diversas propriedades biológicas, dentre elas o alho (*Allium sativum L.*) (Figura 4), pertencente à família botânica das Liliaceae, considerado como uma das fontes mais ricas de compostos fenólicos entre os vegetais (MARTINS et al., 2016). Dentre as diversas atividades biológicas relacionadas ao alho destaca-se o efeito contra uma ampla gama de microrganismos entre eles bactérias, inclusive apresentando ação antibacteriana em bactérias que acometem os peixes teleósteos cultivados (SAHU et al., 2007; NYA, DAWOOD AUSTIN, 2010; ALIY, MOHAMED, 2010; TALPUR, IKHWANUDDIN, 2012). Seu efeito como antimicrobiano é atribuído à presença da alicina e seus derivados (NYA, DAWOOD, AUSTIN et al., 2010; HUSSEIN, MOUSSA, 2013).

Figura 4. Bulbo de *Allium sativum L.*

Fonte: do autor

Além do alho outra planta com potencial antibacteriano é o eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (Figura 5. A e B) que é nativo da Austrália, pertencente à família Myrtaceae, caracterizada por ser uma importante fonte de óleos essenciais com uma grande gama de atividades biológicas, tais como antibacteriano, antifúngico, analgésico e apresenta ainda propriedades antiinflamatórias (MULYANINGSIH et al., 2010). As folhas do eucalipto contêm níveis elevados de óleos essenciais que são ricos em compostos fenólicos que estão associados com suas atividades biológicas, entre eles o ácido gálico responsável pela sua atividade antibacteriana. Segundo Ammer et al., (2016) e Pereira et al., (2013), o extrato da folha de eucalipto apresenta efeito antibacteriano *in vitro* sobre *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 5. Estrutura reprodutiva do Eucalipto (*Eucalyptus* sp.), B) Árvore de *Eucalyptus* sp



Fonte: A) <http://br.innatia.com/c-plantas-anti-inflamato-pt/a-propriedades-anti-inflamatorias-do-eucalipto-8948.html>; B) do autor.

Assim como o alho e o eucalipto, a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (Figura 6 A, B e C) também representa uma fonte potencial para estudos de atividade antibacteriana. A erva-mate pertence à família Aquifoliaceae, é uma planta subtropical encontrada na América do Sul, principalmente no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (HECK, DE MEJIA, 2007). Há estudos demonstrando seu efeito antimicrobiano em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (COGO et al., 2010; DE BIASI, GRAZZIOTIN, HOFMANN, 2009) devido, principalmente, à presença de compostos fenólicos, cujos principais representantes são os ácidos gálico, siríngico, caféico, ferúlico, p -cumárico, clorogênico (PAGLIOSA et al., 2010), além de alcalóides (cafeína e teobromina),

flavonóides (rutina e luteolina) e saponinas (BARG, 2004). Segundo MARTIN et al., (2013) a erva-mate apresentou efeito antibacteriano *in vitro* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*.

Figura 6.A) Estrutura reprodutiva da *Ilex paraguariensis*. B) Árvore nativa da coleta. C) Cultivo comercial de *Ilex paraguariensis*.

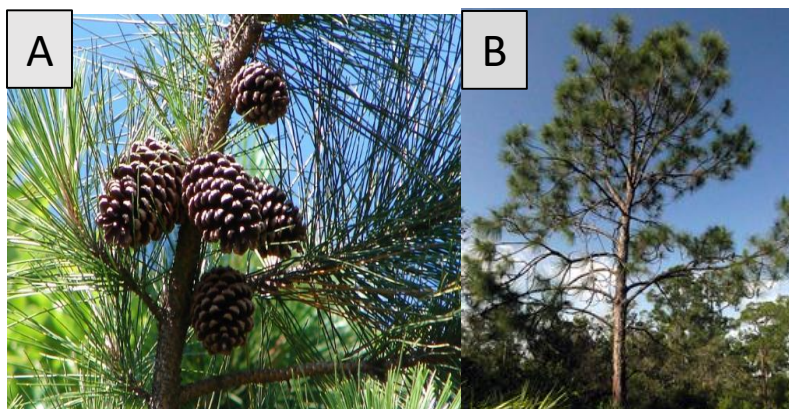


Fonte: A) <http://www.fazendacitra.com.br/site>. B) do autor, C) <http://chimarrao.net/erva-mate>.

O gênero *Pinus* (Figura 7 A e B) também contém plantas com grande potencial antibacteriano. Pertence à família Pinaceae, ocorre naturalmente no hemisfério norte e foi implantado nas regiões temperadas do hemisfério sul. *Pinus elliottii* apresenta uma grande quantidade de compostos fenólicos e terpenoides como flavonoides glicosídeos e estilbenos (FANG, SU, CHENG, 1988), além da oleorresina que é uma fonte natural abundante de diterpenos que desempenham atividades antimicrobianas (STUBBS et al., 1984; LEE et al., 2001). Segundo Feng, Han, Wang, (2010) a composição química do extrato aquoso da folha de pinus apresentou mais de 10 compostos diferentes, entre eles o ácido hexadecanóico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido malônico, ácido málico e ácido oxálico. Avaliando a atividade antibacteriana do extrato aquoso das folhas *in vitro*

foi verificada a efetividade contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris* (FEKIH et al., 2014).

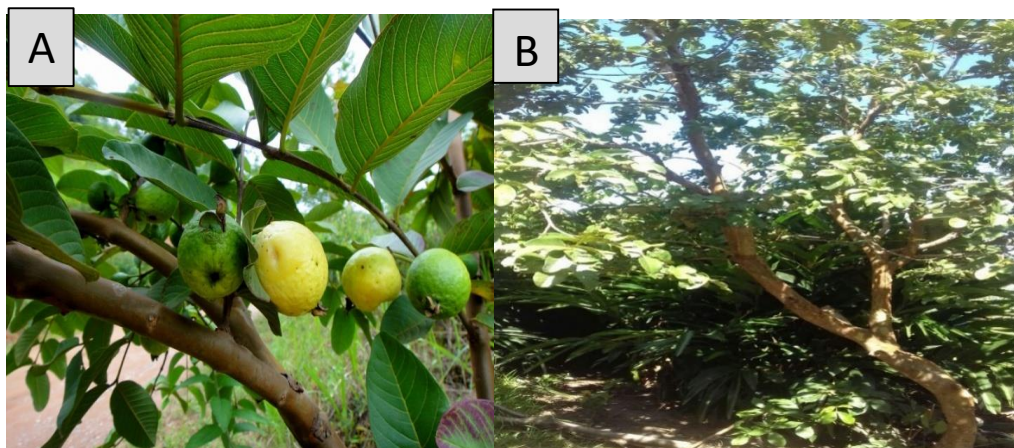
Figura 7.A) Estrutura reprodutiva de *Pinus elliottii*, B) Árvore de *Pinus elliottii*



Fonte: A) https://pt.wikipedia.org/wiki/Pinus_elliottii; B) http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_TQBH9684&res=640&flags=glean.

A diversidade de espécies de plantas bem como o grande número de compostos estruturalmente diferentes e suas atividades biológicas já relatadas reforçam a importância dos estudos com princípios ativos que possam contribuir no tratamento e prevenção de doenças na piscicultura. Um exemplo dessas plantas é a goiabeira (*Psidium guajava* L.). Esta planta pertence à família Myrtaceae, é uma planta tropical nativa do México (GUTIÉRREZ, MITCHELL, SOLIS, 2008) e se estende por toda a América do Sul, Ásia, Europa e África. A goiabeira apresenta nas suas folhas compostos bioativos entre eles os triterpenos, flavonoides, taninos e carotenóides (GUTIÉRREZ, MITCHELL, SOLIS, 2008). Juntamente com a presença das substâncias α -terpineol, 1,8-cineol, β -cariofileno, óxido de cariofileno, que em estudos demonstram efeito antibacteriano dos extratos das folhas da goiabeira frente a bactérias Gram-negativas (GHOSH, et al., 2014; OBINNA, NWODOS, OLAYINKA, 2008). Além de possuir atividade antimicrobiana, como demonstrado *in vitro* frente à *S. aureus* por Fernandes et al., (2014) também apresenta atividades antiinflamatória, antioxidante (ABDELRAHIM et al., 2002; CHEN, YEN, 2007; KIM et al., 2016; LIMA et al., 2009; METWALLY et al., 2011) e imunoestimulante observado por Giri et al., (2015), onde a utilização da goiabeira na alimentação do peixe *Labeorohita* contribuiu para a diminuição da mortalidade no desafio *in vivo* frente à bactéria *A. hydrophila*.

Figura 7.A) Frutos de *Psidium guajava* L. B) Árvore de *Psidium guajava* L.



Fonte: A) <http://come-se.blogspot.com.br/2012/02/goiaba-madura-na-beira-da-estrada.html>, B) do autor

Na busca por alternativas é importante salientar o aumento do número de trabalhos que relatam o uso de plantas medicinais para melhorar as condições de saúde e bem-estar animal durante o cultivo. Porém são poucos os trabalhos que relatam a ação de plantas medicinais sobre patógenos causadores de enfermidades em peixes, e suas formas de tratamento.

Na piscicultura existem basicamente três formas de tratamento de doenças: os banhos terapêuticos, a incorporação do medicamento no alimento e por último o tratamento através da utilização de produtos injetáveis (PAVANELLI, 2008). Segundo Pavanelli, (2008) a incorporação do medicamento no alimento, apresenta grandes vantagens como redução no estresse do peixe devido à ausência dos processos de captura e transporte, e de não ter o seu habitat modificado pela adição/presença do medicamento. Normalmente é empregado para combater bactérias sistêmicas, e também infecções locais principalmente intestinais. A dificuldade dessa forma de tratamento é a perda de apetite que é um dos sinais clínicos da maioria das doenças bacterianas, dificultando assim a assimilação do medicamento pelo peixe. Devido a esse fato os tratamentos que utilizam a incorporação do medicamento na ração são feitos de forma preventiva, agindo no organismo como imunoestimulantes e não como terapêuticos (ANDERSON, 1992; GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010). Com o desenvolvimento dos cultivos intensivos e consequente aumento da produção, surge a necessidade de alternativas para o controle de enfermidades, uma vez que o uso dos modelos de intervenção terapêutica atuais na prática da piscicultura muitas vezes apresenta dificuldades de execução (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Associada à crescente demanda por proteína animal devido ao aumento do consumo *per capita* de pescado em nível mundial observa-se uma aceleração do processo de intensificação do cultivo de pescado. Como consequência ocorre o aumento na incidência de doenças, principalmente as bacterianas, as que não possuem medicamentos específicos para o uso em piscicultura e os medicamentos convencionalmente utilizados geram riscos. Assim, se faz necessário a descoberta/comprovação de outras fontes de tratamento, entre elas as plantas e fitoterápicos com atividade antibacteriana, buscando assim suprir essa demanda do sistema produtivo intensivo da piscicultura, bem como proteção ambiental e do consumidor. Principalmente ao se pensar em Agroecologia, na busca por técnicas mais sustentáveis alternativas e naturais para o tratamento/prevenção de doenças bacterianas na piscicultura intensiva.

4. METODOLOGIA

4.1. Plantas utilizadas e coleta do material vegetal

Para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionadas plantas com relato de efeitos ou efeitos/potenciais antibacterianos, conforme apresentado na seção de revisão bibliográfica.

O extrato de alho (*Allium sativum* L.) foi adquirido comercialmente da empresa Active Pharmaceutics (São José- SC, Brasil).

Para o pinus (*Pinus elliottii*), o eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foram coletadas folhas frescas no período da manhã, nas dependências da UFFS - *Campus* Laranjeiras do Sul, no período da primavera, e no mesmo período foram coletadas folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), em Unidade de Produção e vida Familiar nas proximidades da UFFS - *Campus* Laranjeiras do Sul. Após a coleta, as folhas de pinus, eucalipto, erva-mate e goiabeira foram lavadas em água destilada e higienizadas.

4.2. Preparo dos extratos

O preparo de todos dos extratos foi realizado nos laboratórios de química analítica e química orgânica da Universidade Federal da Fronteira Sul. Para o extrato de pinus foram maceradas 3g de folhas frescas (acículas) de pinus e transferidos para Erlenmeyer com 50mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 60°C durante 2 minutos (devido à volatilidade dos compostos do pinus) e após, quando alcançou a temperatura ambiente a mistura foi filtrada em papel de filtro (KRISHNASWAMY, ORSAT, 2015). Da solução resultante foi obtido o extrato seco pela remoção do solvente em rota-evaporador.

As folhas para o preparo do extrato de eucalipto foram deixadas secar na estufa a 27°C, até peso constante. Na sequência foram moídas em moinho de facas e armazenadas em garrafas âmbar hermeticamente fechadas e guardadas protegidas da luz. Foi transferido 50g do pó das folhas para um Erlenmeyer, adicionado 200mL de metanol

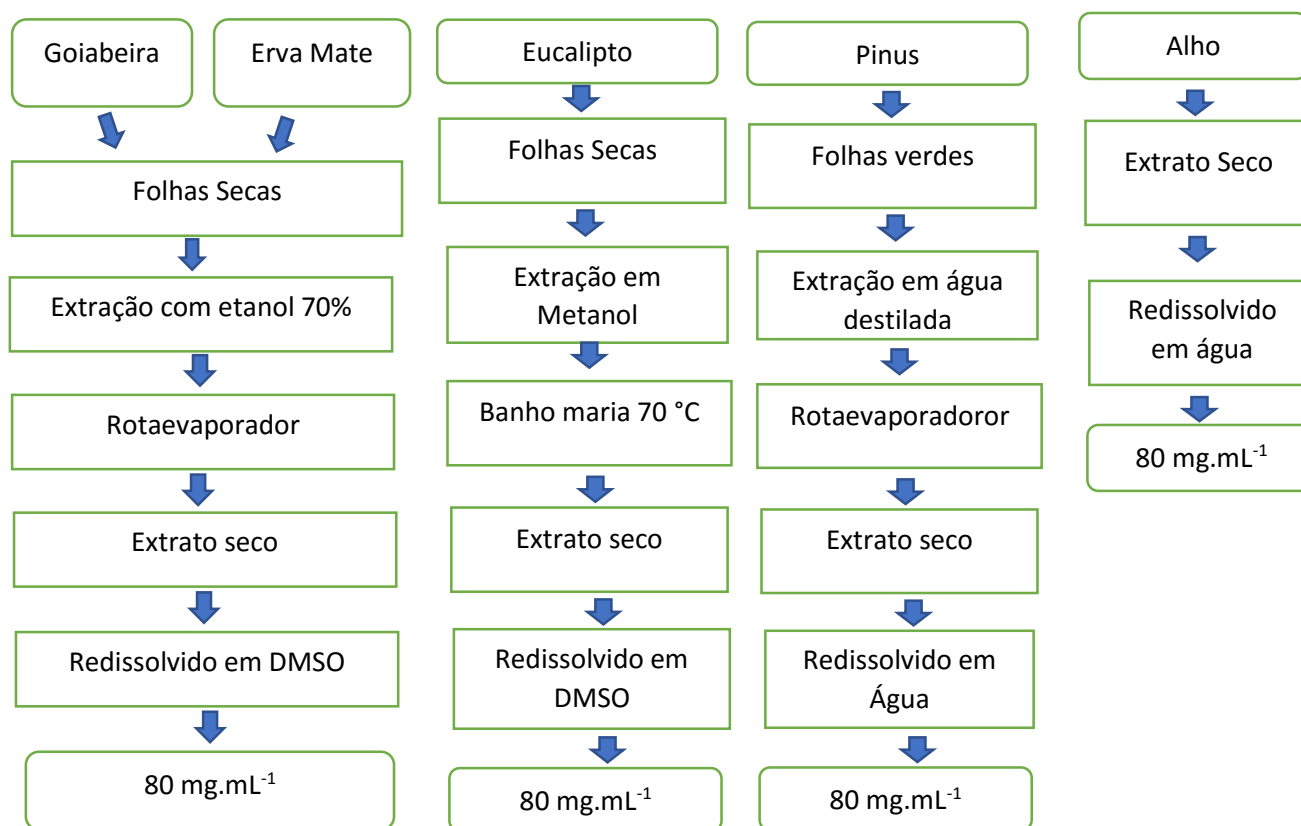
sendo a mistura fervida em banho-maria durante 1h, protegido da luz. Após esse período o frasco com a mistura foi mantido à temperatura ambiente durante 5 dias com homogeneização ocasional, protegido da luz. Após o tempo estipulado, o extrato líquido foi submetido a centrifugação a 5000rpm durante 10min. O sobrenadante foi transferido para frasco que foi aquecido em banho-maria a 70 °C para a evaporação do metanol (AMMER et al., 2016).

Para o preparo do extrato de goiabeira, as folhas frescas foram secas em estufa, a 45°C, até massa constante e moídas em moinho de faca com peneira de 20-mesh. O pó foi armazenado em recipiente plástico hermeticamente fechado, protegido de luz e mantido à temperatura ambiente. Foi realizada extração por agitação magnética, por 60 min., utilizando como solvente etanol 70%, a 50°C, razão planta solvente de 1:10 (p/v). A solução obtida foi filtrada e o solvente removido em rota-evaporador a 50°C, até obter o extrato seco (FERNANDES et al., 2014).

Para o preparo do extrato de erva-mate, as folhas foram secas em estufa a 45°C, até peso constante e moídas em moinho de faca. 20g do pó das folhas de erva-mate foi macerado em 250mL de etanol 70%, e a solução foi mantida à temperatura ambiente durante 3 dias, com homogeneização ocasional. A solução obtida foi filtrada e o solvente removido em rota-evaporador a 50°C, até obter o extrato seco (PEREIRA et al., 2012).

Na sequência todos os extratos secos das plantas foram redissolvidos, à fim de obter as diferentes concentrações de extrato bruto das plantas para realização dos ensaios *in vitro* e posteriormente *in vivo*. Os extratos de pinus e alho foram redissolvidos em água destilada, e os extratos de eucalipto, erva-mate e goiabeira foram redissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), todos na concentração inicial de 80 mg.mL⁻¹. A metodologia de preparo de todos os extratos foram organizadas simplificadaamente em um fluxograma (figura 9).

Figura 8. Fluxograma do preparo dos extratos de goiabeira, erva mate, eucalipto, pinus e alho.



4.3. ENSAIOS *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* foram realizados no laboratório de microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul- *Campus* Laranjeiras do Sul-PR.

4.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Microplacas de 96 poços estéreis foram utilizadas para o ensaio. A cada poço foram adicionados 100µL de caldo Mueller-Hinton. No primeiro poço de cada linha das microplacas foi adicionado um volume de 100µL do respectivo extrato de planta na concentração inicial de 80 mg.mL⁻¹(FERNANDES et al., 2014), obtendo-se a concentração inicial de cada extrato. A partir desses poços iniciaram-se as diluições seriadas de base 2 nos demais poços obtendo-se concentrações decrescentes. Como controles, em um poço foi adicionado somente o extrato bruto de cada planta, um poço somente com a bactéria e um poço com bactéria mais o solvente orgânico DMSO. Na sequência foram adicionados 5 µL de suspensão bacteriana de *A. hydrophila* (CPQBA 228-08) ou de *S. agalactiae* (ATCC 12386). As microplacas foram seladas com filme selador, agitadas e em seguida, incubadas em estufa, a 28 °C (±2 °C) por 24 h.

O valor de MIC foi determinado com metodologia proposta por Mian, (2006) com o auxílio de um anteparo luminoso (lâmpada), como sendo a menor diluição do extrato de planta capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano visível a olho nu, em conformidade com o CLSI- *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute*, (2005).

4.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Afim de avaliar a sensibilidade das bactérias *A. hydrophila* e *S. agalactiae* frente aos extratos brutos das plantas erva-mate, goiabeira, pinus, alho e eucalipto, foi realizado o antibiograma partindo-se das concentrações utilizadas no ensaio de MIC.

A atividade antimicrobiana foi verificada *in vitro*, pelo método de difusão em ágar (BAUER et al., 1966), com modificações, onde foi avaliado o efeito antibacteriano dos extratos de plantas frente às bactérias *A. hydrophila* (CPQBA 228-08) e *S. agalactiae* (ATCC 12386). Para a determinação da atividade antibacteriana foi utilizada a técnica de poço segundo Grove e Randall, (1955), com modificações. Os inóculos bacterianos foram preparados a partir de culturas novas (18-24h) produzidas a partir de uma única colônia crescida em ágar nutriente, e ajustadas a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Os inóculos foram semeados de acordo com metodologia proposta por CLSI, (2005) em placas de Petri de 90 mm preparadas com Ágar Mueller Hinton para a bactéria *A. hydrophila* (CPQBA 228-08), enquanto que para a bactéria *S. agalactiae* (ATCC 12386) foi utilizado Ágar Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Foram perfurados sete orifícios de forma equidistante. Esses orifícios foram preenchidos com 40µL de cloranfenicol (controle positivo), 40µL de DMSO (controle negativo) e 40 µL de cada um dos cinco extratos (alho, erva-mate, eucalipto, goiabeira e pinus) em cinco concentrações (80, 40, 20, 10, 5 mg.mL⁻¹). As placas foram incubadas aerobicamente a 35°C durante 16-18h. Após o tempo especificado, cada placa foi examinada, e as zonas resultantes de inibição (halos de inibição) foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro digital.

Para classificação dos halos de inibição, foi utilizada a metodologia proposta por Costa, Racanicci, Santana, (2017) que consideraram halos acima de 10 mm como sensíveis e abaixo de 10 mm como resistentes.

4.4. ENSAIOS *IN VIVO*

A primeira parte desse trabalho teve como objetivo estudar o potencial antibacteriano de diferentes extratos de plantas *in vitro*. Com base nos resultados destes ensaios (*S. agalactiae* resistente a todos os extratos testados e *A. hydrophila* sensível ao extrato de erva-mate) apresentados em detalhe na seção Resultados e Discussão foi realizada a suplementação da ração com diferentes concentrações de erva mate, alimentação dos juvenis de tilápia e desafio com *A. hydrophila*.

4.4.1 Instalações

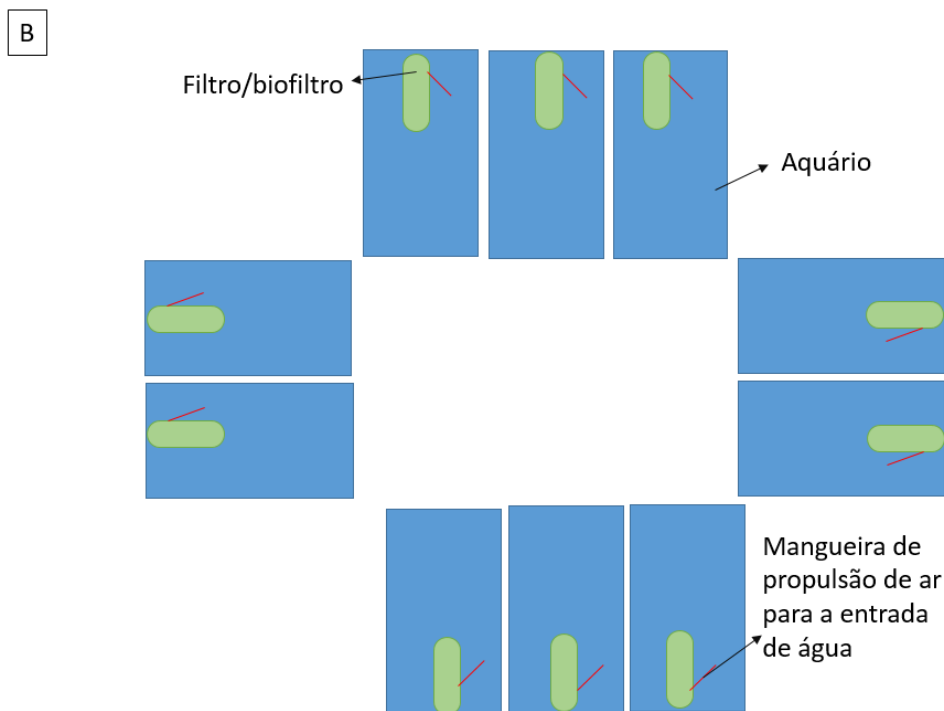
O experimento foi realizado no laboratório de Patologia da Universidade Federal da Fronteira Sul *Campus* Laranjeiras do Sul-PR. Foram utilizados juvenis da espécie *O. niloticus* com aproximadamente 7 cm e peso inicial em torno de 8 g, proveniente de piscicultura comercial, Akna Alevinos, Toledo-PR. O protocolo deste experimento foi aprovado na CEUA/UFFS sob o número 23205.004767/2016-82.

O sistema de recirculação de água era do tipo fechado, os aquários eram constituídos de caixas plásticas pretas com 50 L de água, em cada aquário a entrada e saída de água era individual e com aeração direta. Cada aquário teve um sistema de recirculação de água constituído por filtro e biofiltro. O filtro consistiu de um filtro para depurador (Scotch Brite (bidin)). O biofiltro foi constituído de uma garrafa PET preenchida com pedra brita acoplado ao sistema de aeração e posicionado acima do aquário. O filtro ficou sobreposto ao biofiltro dentro da garrafa PET, e realizada limpeza diariamente. A circulação da água foi realizada forçando a água por pressurização do ar, com o auxílio de uma mangueira, no interior de um tubo de PVC acoplado à entrada do filtro e mergulhado na água do aquário. A saída da água do filtro foi por gravidade.

Figura 9. A) Foto do sistema de recirculação B) esquema do sistema de recirculação.



Fonte: do autor.



Fonte: do autor.

Os aquários foram mantidos nas seguintes condições experimentais: em ambiente climatizado a 26 °C, com água em temperatura próxima a 24 °C, sendo essa temperatura a padrão da região, oxigênio acima de 5 mg/L, amônia abaixo de 0,1 mg/L e pH na faixa de 7,0 valores estes próximos aos propostos para a espécie segundo Kubitz, (2011).

4.4.1.1 Qualidade de água

Durante todo o experimento foi realizado monitoramento diário das variáveis de qualidade de água já descritos, com auxílio de sonda multiparâmetro. O nitrito e nitrato foram mensurados com auxílio de Kit colorimétrico comercial para produtor. O sistema, aquários e biofiltros, recebeu água doce clorada e posteriormente teve o cloro retirado por filtro. Os aquários entraram em funcionamento 20 dias antes do início do experimento para a maturação do biofiltro, garantindo assim o nível de amônia abaixo de 0,1 mg/L (conforme preconizado).

4.4.2 Condições gerais de aclimação e manutenção dos animais durante os experimentos

Os animais foram recebidos no Laboratório de Patologia da Universidade Federal da Fronteira Sul-Campus Laranjeiras do Sul, e foram submetidos à banho de imersão em solução salina 3% por 10 minutos com objetivo de profilaxia à agentes patogênicos (PAVANELLI et al., 2008). Os animais foram mantidos no sistema de circulação por um período de aclimação de sete dias antes do início do experimento.

Durante o período de aclimação e durante o experimento os animais foram alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial “Supra Tilápia”, níveis de garantia mínima de proteína bruta 36%. Alimentação até a aparente saciedade. A retirada de resíduos foi feita através de sifonamento dos aquários, diariamente, 30 minutos após o fornecimento de alimento. Também foi realizada a adição diária de água para reposição do volume perdido por evaporação e limpeza dos aquários.

Ao início e final do experimento foi realizado biometria total mensurando peso, comprimento total, comprimento padrão e altura. Estes parâmetros foram determinados utilizando uma balança digital e um ictiômetro. Com base nestes dados, foram calculados a taxa de crescimento específico (TCE) (fórmula 01), o fator de condição (FC) (fórmula 02) e a taxa de sobrevivência (TS) (fórmula 03). Para a determinação do ganho de peso (GP) foi empregada a fórmula adaptada de Costa, (2014) (fórmula 04).

Fórmula 01

$$TCE = 100 \times (\ln \text{biomassa final} - \ln \text{biomassa inicial}) / n^{\circ} \text{ de dias de tratamento}$$

Fórmula 02

$$FC = (\text{peso} \times 100) / (\text{comprimento total} \times 3)$$

Fórmula 03

$$TS = (\text{Número Inicial de peixes estocados} - \text{Número Final de peixes estocados}) \times 100$$

Fórmula 04

$$GP (\%) = (\text{Somatória do Peso final} - \text{Somatória do Peso Inicial}) / 100.$$

4.4.3 Protocolo experimental

4.4.3.1 Suplementação na ração com diferentes concentrações de erva-mate

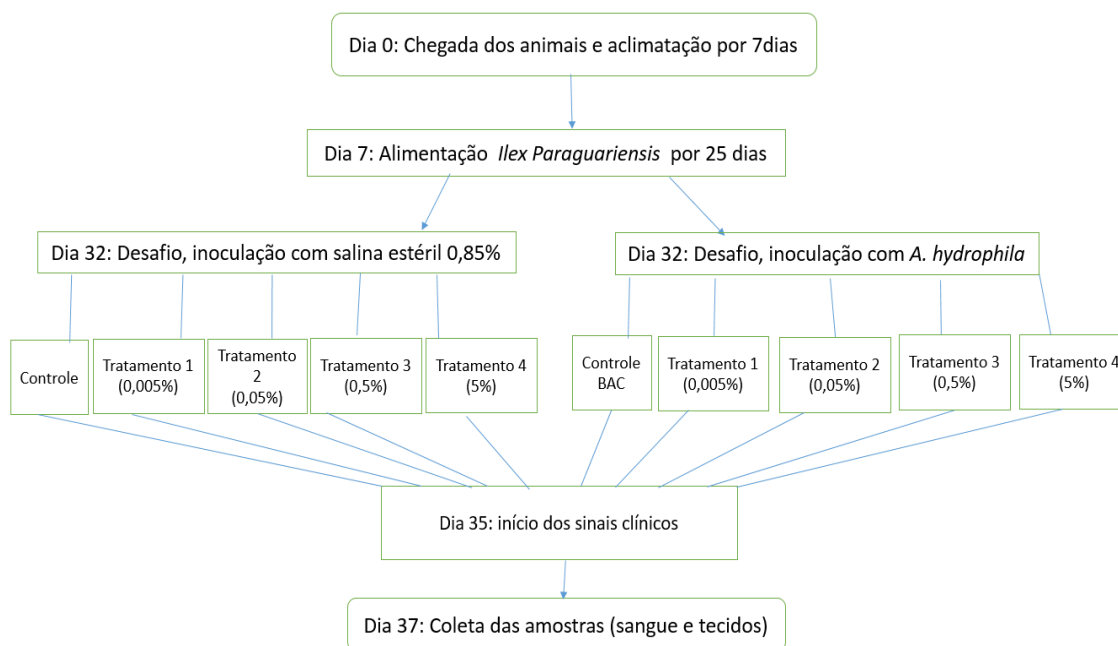
Foi realizado o tratamento via oral pela incorporação do extrato bruto de erva-mate na ração. Para isso, a ração comercial foi moída e o extrato foi adicionado na forma de pó. Na sequência, a ração foi novamente peletizada e seca em estufa à 80 °C. Após o período de aclimação, iniciou-se a alimentação dos animais com ração suplementada com extrato de erva-mate durante 25 dias. Ao final deste período, os animais foram desafiados com injeção intraperitoneal de *A. hydrophila* sendo que os mesmos foram acompanhados por mais 5 dias mantendo a ração suplementada com extrato de planta.

Para o ensaio os animais foram divididos em diferentes grupos e submetidos à suplementação dietética: Controle: animais que receberam a ração sem adição de extrato de erva-mate; Controle/BAC: animais que receberam ração sem adição de extrato de erva-mate e foram desafiados com inóculo da bactéria *A. hydrophila*; Tratamento 1 (concentração 0,005%): animais que receberam a ração com adição de extrato de erva-mate na concentração 0,005%; Tratamento 1/ BAC (concentração 0,005%/BAC): animais que receberam a ração com adição de extrato de erva-mate na concentração 0,005% e foram desafiados com inóculo da bactéria *A. hydrophila*; Tratamento 2 (concentração 0,05%): animais que receberam a ração com adição de extrato de erva-mate na concentração 0,05%; Tratamento 2/ BAC (concentração 0,05%/BAC): animais que receberam a ração com adição de extrato de erva-mate na concentração 0,05% e foram desafiados com inóculo da bactéria *A. hydrophila*; Tratamento 3 (concentração 0,5%): animais que receberam a ração com adição de extrato de erva-mate na concentração 0,5%; Tratamento 3/ BAC (concentração 0,5%/BAC): animais que receberam a ração com adição de extrato de erva-mate na concentração 0,5% e foram desafiados com inóculo da bactéria *A. hydrophila*; Tratamento 4 (concentração 5%): animais que receberam a ração com adição de extrato de erva-mate na concentração 5%; Tratamento 4/ BAC (concentração 5%/BAC): animais que receberam a ração com adição de extrato de erva-mate na concentração 5% e foram desafiados com inóculo da bactéria *A. hydrophila*, como representado no fluxograma da Figura 11.

4.4.3.2 Preparo do inóculo e desafio com *A. hydrophila*

Os peixes foram desafiados com *A. hydrophila* através de injeção intraperitoneal de acordo com a descrição do protocolo acima. A cepa bacteriana foi preparada no laboratório de Microbiologia da UFFS - Campus Laranjeiras do Sul. Foi realizada a incubação da bactéria em placa de petri em ágar nutriente a 30 °C, por 24 h. Após, o inóculo de *A. hydrophila* foi ajustado à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). A infecção experimental foi realizada com a injeção de um inóculo de 0,1 mL intraperitonealmente (IP) na concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ de *A. hydrophila* em solução fisiológica estéril. No grupo controle foi inoculado 0,1 mL (IP) de solução fisiológica estéril, adaptado de Dotta, (2013). Como representado no fluxograma da Figura 11.

Figura 10. Fluxograma do experimento com suplementação de erva-mate na ração para *O. niloticus*.



Fonte: Do autor.

4.4.4 Coleta de amostras

Ao final dos tratamentos, todos os peixes foram anestesiados com óleo de cravo (50 mg/L) como proposto por Pallamin, (2014) e submetidos a punções caudais com uso de seringa contendo anticoagulante heparina, sendo esse processo realizado

sequencialmente com um peixe por vez, utilizando os animais do mesmo grupo. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do estado anestésico com óleo de cravo conforme as recomendações do Comitê de Ética no Uso dos Animais/ UFFS e CONCEA para posterior remoção dos órgãos, sendo o fígado e o rim retirados e armazenados em ultra-freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores avaliações bioquímicas.

4.4.5 Análises Bioquímicas

O plasma e amostras de fígado dos juvenis de Tilápia foram utilizados para as dosagens bioquímicas de glicose, atividade de aspartatoamino-transferase (AST) e atividade de alanina-aminotransferase (ALT) utilizando kits comerciais e seguindo as instruções dos fabricantes. As concentrações de proteína foram determinadas por meio do método de Bradford, (1976), utilizando albumina bovina como padrão em um comprimento de onda de 595 nm. O conteúdo de glicogênio hepático foi determinado segundo a metodologia proposta por Krisman, (1962).

Para a determinação dos níveis dos marcadores de dano oxidativo, assim como da atividade das enzimas antioxidantes amostras de fígado foram homogeneizadas com uma solução contendo PBS, pH 7,2 e centrifugadas a 5000 xg por 10 min. Uma alíquota do sobrenadante foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford, (1976). As determinações enzimáticas foram realizadas usando-se o sobrenadante da centrifugação dos homogenatos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.4.5.1 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Aebi, (1984), que é baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio. O meio de reação foi formulado com 10 µg de proteína em peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão Tris (50 mM), EDTA (0,25 mM) e pH 8,0 em volume final de 2 mL. A leitura foi realizada espectrofotometricamente (Thermo Scientific) a 240 nm e os resultados foram expressos em mmol de peróxido de hidrogênio degradado $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

4.4.5.2 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente (Thermo Scientific) de acordo com Habig, Pabst, Jacoby, (1974). A reação baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH no substrato, formando complexo mensurável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra foi adicionada ao meio de reação contendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), GSH 0,1 M e tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 em microplaca de 96 poços. Os valores foram expressos em $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.4.5.3 Determinação do conteúdo de Glutathiona Reduzida (GSH)

Os níveis de glutathiona reduzida foram medidos em homogenato de fígado, preparado em 10 volumes de ácido tricloroacético 12%, seguido por centrifugação a 5000 xg durante 5 minutos. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio. Uma alíquota das amostras foi acrescentada em tampão fosfato 0,2 M pH 8,0. Após, DTNB 2,5 mM (5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) foi adicionado e a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 412 nm (BEUTLER, DURON, KELLY, 1963). Os resultados foram expressos em gráficos como conteúdo de GSH $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, posteriormente convertidos em $\text{mM}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$.

4.4.5.4 Determinação do conteúdo de Lipoperoxidação - (TBARS)

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidos no sobrenadante dos homogenatos de fígado. Para preparação da amostra o meio contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína da amostra e ácido tricloroacético (TCA) 6,7% em volume final de 180 μL , foi agitado em vórtex, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm a 4 °C. Após, 40 μL do sobrenadante foi incubado com meio de reação contendo hidroxitoluenobutilado (BHT) 0,007 mg/mL em etanol 95%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 3,1 mg/mL em NaOH 0,3%, TCA 7,9% em PBS, em volume total de 315 μL , durante 60 minutos a 60 °C. Posteriormente, o material foi resfriado e a mensuração do cromóforo rosa foi realizada espectrofotometricamente (Thermo Scientific) a 535 nm. Os valores foram expressos em $\text{nmol MDA}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹.

¹, a partir de curva de calibração preparada com malondialdeído (MDA) nas mesmas condições de análise (FEDERICI, SHAW, HANDY, 2007).

4.4.5.5 Determinação do conteúdo de proteína carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado na amostra pelo método descrito por Levine et al., (1994). Inicialmente foram adicionados 100 µL do sobrenadante dos homogenatos de fígado em 600 µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 M preparado em solução de HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após, foi adicionado 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 28 % com agitação seguido de banho de gelo durante 10 min, e centrifugação (5 min a 10.000 xg) e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 10.000 xg), com 800 µL de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Finalmente, o pellet foi ressuspensionado com 900 µL de hidrocloreto de guanidina 6,0 M, centrifugado a 9000 xg a 4 °C por 3 min e o sobrenadante transferido para microplaca de 96 poços para leitura a 360 nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol⁻¹.mg proteína⁻¹.

4.4.5.6 Atividade da lisozima

A atividade da lisozima sérica foi mensurada por espectrofotometria de acordo com a metodologia de Ellis, (1990), com modificações (ABD-EL-RHMAN et al., 2009). Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) (75 mg/mL) em tampão fosfato 0,1 M com NaCl 0,09% (pH 5,8) foi utilizada como substrato. Para a curva padrão foi utilizado lisozima liofilizada (1mg/mL) de clara de ovo de galinha (Sigma) em tampão fosfato 0,1 M com NaCl 0,09% (pH 5,8). Para cada ensaio foi preparada uma nova curva padrão. Para a realização do ensaio, 25 uL das soluções padrão bem como das amostras de plasma inativado de *O. niloticus* (banho-maria a 56 °C por 30 minutos) foram pipetadas em duplicata em microplaca de 96 poços e rapidamente acrescidas de 175 uL da suspensão de *M. lysodeikticus* 0,075% (75 mg/mL em tampão fosfato 0,1 M com NaCl 0,09 %, pH 5,8). Após agitação, a redução na densidade óptica (ΔDO) foi acompanhada em espectrofotômetro a 492 nm com medidas a cada 30 segundos por 20 min. O cálculo da atividade foi feito pelo delta da absorbância e os resultados foram expressos em µg⁻¹ mL de lisozima⁻¹.

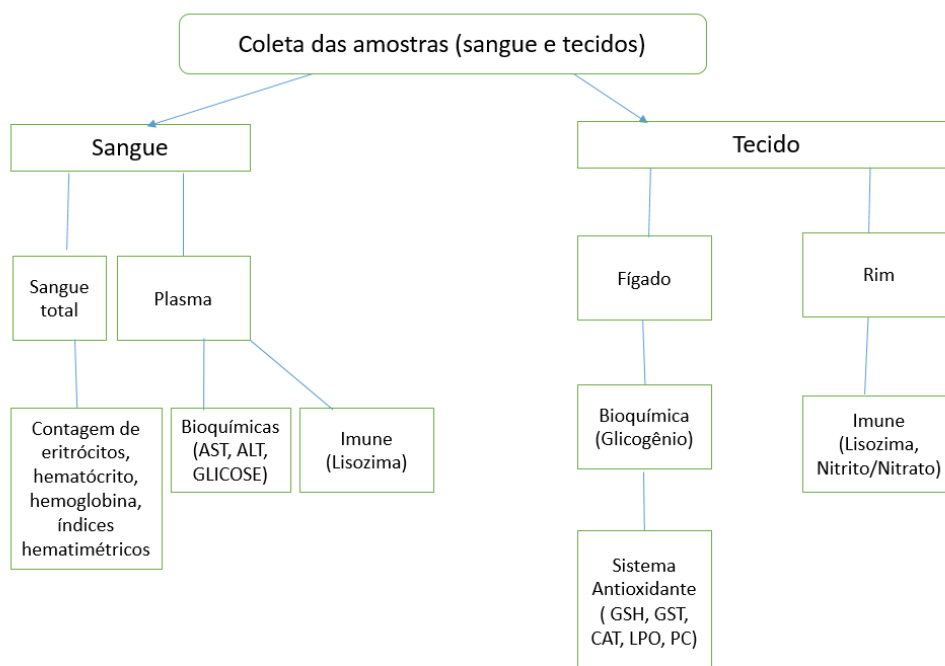
4.4.5.7 Determinação das concentrações de nitrito/nitrato ($\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$)

A presença de NO foi estimada por meio da formação de seus metabólitos: nitrato (NO^{3-}) e nitrito (NO^{2-}), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). O homogenato de rim (50 μL) foram incubadas com o mesmo volume da solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) em microplaca durante 20 minutos, a 37 °C (MIRANDA, ESPEY, WINK, 2001). A reação de NO^{2-} com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades ópticas em leitora de microplacas em 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) em PBS (pH 7,2) (0-150 μM) e expressos em μM .

4.4.6 Análises Hematológicas

O sangue coletado com anticoagulante foi separado em alíquotas, uma para a análise da contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer, outra para a dosagem de hemoglobina, além da alíquota armazenada em capilares de microhematócrito para determinação do percentual de hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). A metodologia *in vivo* está compilada no fluxograma da Figura 12.

Figura 11. Fluxograma geral da metodologia *in vivo*.



Fonte: Do autor.

4.4.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm Desvio Padrão. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância de uma para os parâmetros zootécnicos e de qualidade de água, e de duas vias para as análises fisiológicas através do programa R versão 3.4.3. A normalidade dos dados foi verificada pelo Teste de Shapiro-Wilk, a homocedasticidade foi verificada através do Teste de Bartlett e a comparação das médias foi feita através do Teste LSD (R, CORE, TEAM, (2018). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um $p \leq 0,05$.

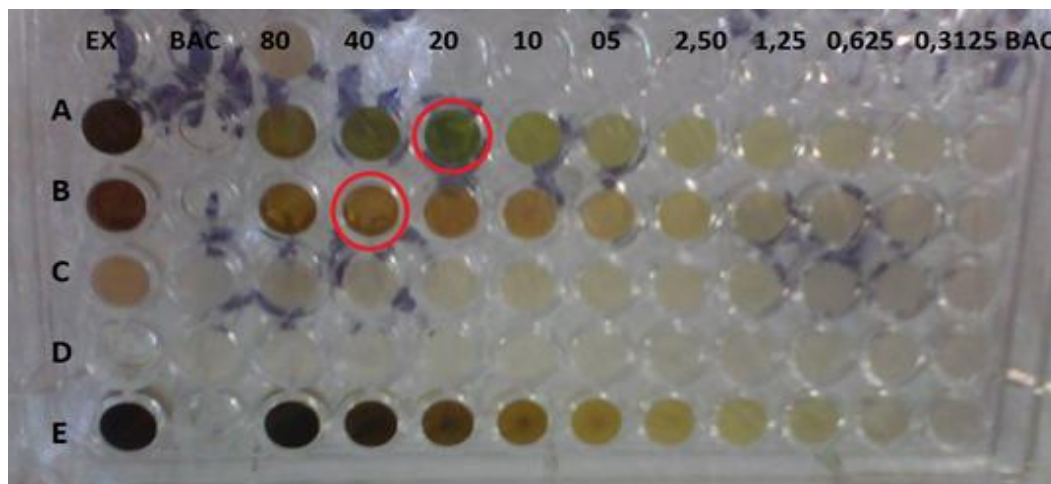
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimentos *in vitro*

5.1.1. MIC

A primeira etapa do trabalho teve como objetivo estudar o potencial antibacteriano de extratos de erva mate, goiabeira, pinus, alho e eucalipto frente a bactérias causadoras de doenças em peixes. A figura 13 apresenta o experimento de MIC onde pode ser observado que somente os extratos de erva-mate (MIC em 20 mg.mL⁻¹) e goiabeira (MIC em 40 mg.mL⁻¹) apresentaram efeito inibitório frente à bactéria *A. hydrophila* (CPQBA 228-08). Para a bactéria *S. agalactiae* (ATCC 12386) nenhum dos extratos apresentou efeito inibitório de crescimento.

Figura 12. MIC para *A. hydrophila* (CPQBA 228-08). Microplaca com os extratos de (A) erva-mate, (B) goiabeira, (C) pinus, (D) alho, (E) eucalipto em diferentes concentrações (mg/mL) após 24 horas de incubação com a bactéria *A. hydrophila* (CPQBA 228-08).



Fonte: A autora

5.1.2. Antibiógrama

No antibiógrama foi utilizado o antibiótico cloranfenicol na concentração de 30 mg.mL⁻¹ como controle positivo em cada placa com as diferentes concentrações dos extratos de cada uma das plantas estudadas. As duas bactérias *A. hydrophila* e *S. agalactiae* se mostraram sensíveis ao antibiótico cloranfenicol. Mas, como pode ser observado na figura 13 apenas a goiabeira (*P. guajava* L.) e a erva-mate (*I. paraguariensis*) apresentaram halos de inibição de crescimento (em mm) para a *A. hydrophila*. Considerando a classificação de De Biasi, Grazziotin, Hofmann, (2009), apenas a erva-mate apresentou halos de inibição considerados sensíveis.

Tabela 3. Antibiógrama com halos de inibição (em mm) para os extratos de erva-mate, goiabeira, pinus, alho, eucalipto em diferentes concentrações após incubação com a bactéria *A. hydrophila* (CPQBA 228-08).

| | Controles | | Concentração dos extratos (mg/mL) | | | | |
|----------------------------|----------------------------|------|-----------------------------------|-----------|-----------|----|----|
| | Cloranfenicol 3,0 mg/mL | DMSO | 80 | 40 | 20 | 10 | 5 |
| <i>Allium sativum</i> | 32,43 ± 1,6 | SH | SH | SH | SH | SH | SH |
| <i>Pinus elliottii</i> | 31,80 ± 0,3 | SH | SH | SH | SH | SH | SH |
| <i>Eucalyptus</i> sp. | 31,41 ± 0,3 | SH | SH | SH | SH | SH | SH |
| <i>Psidium guajava</i> L. | 27,03 ± 4,0 | SH | 5.41 ± 1.4 | SH | SH | SH | SH |
| <i>Ilex paraguariensis</i> | 33,84 ± 1,9 | SH | 11.84 ± 1.5 | 8.6 ± 2.6 | 7.6 ± 5.2 | SH | SH |

Fonte: Becker, (2016). SH- sem halo; Cloranfenicol (controle positivo) presente em cada placa de extrato de planta estudado. Halos de inibição medidos em milímetros. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três repetições.

Podemos observar analisando a tabela 4 que não houve efeito antibacteriano de nenhum dos cinco extratos sobre a bactéria *S. agalactiae*, demonstrando que essa bactéria é resistente aos extratos testados, corroborando o resultado obtido na MIC.

Tabela 4. Antibiógrama com halos de inibição (em mm) para os extratos de erva-mate, goiabeira, pinus, alho, eucalipto em diferentes concentrações após incubação com a bactéria *S. agalactiae* (ATCC 12386).

| | Controles | | Concentração dos extratos (mg/mL) | | | | |
|----------------------------|----------------------------|------|-----------------------------------|----|----|----|----|
| | Cloranfenicol 3,0 mg/mL | DMSO | 80 | 40 | 20 | 10 | 5 |
| <i>Allium sativum</i> | 29,96 ± 17,5 | SH | SH | SH | SH | SH | SH |
| <i>Pinus elliottii</i> | 23,20 ± 0,5 | SH | SH | SH | SH | SH | SH |
| <i>Eucalyptus sp.</i> | 24,86 ± 5,1 | SH | SH | SH | SH | SH | SH |
| <i>Psidium guajava</i> L. | 27,51 ± 2,8 | SH | SH | SH | SH | SH | SH |
| <i>Ilex paraguariensis</i> | 33,35 ± 2,4 | SH | SH | SH | SH | SH | SH |

Fonte: Becker, (2016). SH- sem halo; Cloranfenicol (controle positivo) presente em cada placa de extrato de planta estudado. Halos de inibição medidos em milímetros. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três repetições.

No presente trabalho, foi verificado o potencial antibacteriano *in vitro* de extratos de duas plantas, a goiabeira (*Psidium guajava*L.) e a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a bactéria *A. hydrophila*, uma bactéria Gram-negativa. Dentre as duas plantas o extrato de *I. paraguariensis* apresentou maior efeito antibacteriano com MIC de 20 mg.mL⁻¹ e halo de inibição acima de 10 mm. Esses resultados estão em consonância com outros trabalhos que utilizaram extrato etanólico de *I. paraguariensis* e obtiveram resultados de inibição frente a bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, duas cepas de *Helicobacter pylori* (*H. pylori* 26695 e *H. pylori* J99)] e Gram-positivas (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*) (COGO et al., 2010; GRAZIANI, MELLO, 2011; BITENCURTI-JUNIOR et al., 2012; COSTA, RACANICCI, SANTANA, 2017). Ainda, o extrato de erva-mate, nas concentrações de 100 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹, foi efetivo em inibir o crescimento bacteriano *in vitro* de *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias Gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (bactérias Gram-positivas) com halos acima de 10 mm (DE BIASI, GRAZZIOTIN, HOFMAN, 2009). Considerando os resultados observados e os relatos da literatura o extrato etanólico de erva mate pode ser considerado um potencial agente antibacteriano para uso na piscicultura, tanto no cultivo

quanto no período pós-despesca, uma vez que tem efeitos significativos frente a diversos agentes patogênicos. Cabe ainda ressaltar que o presente trabalho é o primeiro relato do uso do extrato de erva-mate contra bactérias patogênicas para peixes como a *A. hydrophila*.

No presente estudo o segundo extrato que apresentou efeito antibacteriano frente a *A. hydrophila* foi o de *P. guajava*, apresentado valor de MIC de 40 mg.mL⁻¹, e halo de inibição em torno de 5 mm (não considerado sensível). Na literatura o efeito antibacteriano do extrato da *P. guajava* está mais associado a bactérias Gram-positivas, como relatado por Nair, Chanda, (2007) onde as frações metanólicas, acetona e N, N-dimetilformamida (DMF) de folhas de *P. guajava* foram testadas em 91 isolados bacterianas, sendo que a atividade antibacteriana foi mais pronunciada contra estirpes bacterianas Gram-positivas. Atividade moderada foi demonstrada contra as bactérias Gram-negativas estudadas.

Considerando organismos aquáticos, em trabalho realizado com bactérias isoladas de camarão e resistentes à antibióticos, o extrato metanólico de goiabeira mostrou-se efetivo contra *S. aureus* de forma mais efetiva em *Salmonella* spp. De forma mais branda (GONÇALVES et al., 2008). Ainda, já se têm estudos do efeito antibacteriano de *P. guajava* como antibacteriano frente à *A. hydrophila*, em *O. niloticus* (PACHANAWAN, PHUMKHACHORN, RATTANACHAIKUNSOPON, 2008), tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) (GOBI et al., 2016), e em zebra fish (*Daniorerio*) (KIM, et al., 2016). Os dados da literatura e os resultados do presente estudo sugerem que a goiabeira possui compostos que contêm propriedades antibacterianas que podem efetivamente suprimir o crescimento destes organismos quando extraídos utilizando metanol ou etanol como solvente. É necessário salientar que as diferentes formas de extração interferem nos constituintes dos extratos, assim como a época de colheita da planta, interferindo no conteúdo de compostos fenólicos, resultando em diferentes efeitos desse extrato sobre as bactérias (SCHUBERT, 2006; DE BIASI, GRAZZIOTIN, HOFMANN, 2009). As folhas apresentam taninos, óleos essenciais e terpenóides (COELHO, et al., 2016).

5.2 Ensaio *in vivo*

5.2.1. Parâmetros de qualidade de água e zootécnicos

Após o ensaio *in vitro*, verificou-se que a bactéria *S. agalactiae* se mostrou resistente aos todos os extratos de plantas testados. E a goiabeira não apresentou halo de inibição sensível a bactéria *A. hydrophila*, portanto optou-se por realizar o ensaio *in vivo* com a erva-mate, que apresentou halo de inibição sobre a bactéria *A. hydrophila*. Testando seu potencial antibacteriano na suplementação na ração para tilápia.

A tilápia é um peixe tropical com sua faixa ideal de temperatura entre 27 e 31 °C (MACHADO et al., 2010). O nível de oxigênio dissolvido (OD) deve estar acima de 2~3 mg.L⁻¹, o pH entre 6,0 e 7,0, níveis de amônia não-ionizada inferiores a 0,08 mg.L⁻¹ e o nível de nitrito abaixo de 1,00 mg.L⁻¹ (ZIMMERMANN, FITZSIMMONS, 2004). Essa faixa de conforto foi mantida durante o experimento, demonstrando que o extrato de erva-mate não influenciou nos parâmetros físico-químicos da água do cultivo, os dados de qualidade de água foram verificados estatisticamente pela ANOVA de uma via.

Tabela 5 Parâmetros da qualidade da água do experimento, após suplementação de ração cm diferentes concentrações de erva-mate, em juvenis de tilápia desafiados ou não com a *Aeromonas hydrophila*.

| Parâmetros | Físico | | Químicos | | | | | |
|---|--------------|-------------|-----------------|------------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| Variáveis | T | OD | NH ₃ | NH ₄ ⁺ | S | pH | A | D |
| Não desafiado | | | | | | | | |
| C | 23,70 ± 1,05 | 5,15 ± 0,70 | 0,04 ± 0,05 | 0,84 ± 0,56 | 0,11 ± 0,03 | 7,23± 0,42 | 34,00±5,48 | 54,00±11,40 |
| T1 | 23,37 ± 1,21 | 4,85 ± 0,65 | 0,07 ± 0,10 | 0,74 ± 0,61 | 0,06 ± 0,08 | 7,16± 0,44 | 30,00±7,07 | 62,00 ± 27,75 |
| T2 | 23,36 ± 0,88 | 4,63 ± 0,33 | 0,02 ± 0,04 | 0,62 ± 0,68 | 0,14 ± 0,04 | 7,16 ± 0,40 | 30,00±8,16 | 66,00 ± 21,91 |
| T3 | 23,16 ± 1,03 | 5,61 ± 0,56 | 0,09 ± 0,10 | 0,49 ± 0,52 | 0,13 ± 0,03 | 7,45± 0,29 | 24,00 ± 8,94 | 62,00 ± 16,43 |
| T4 | 23,16 ± 1,30 | 5,60 ± 0,73 | 0,04 ± 0,05 | 0,66 ± 0,65 | 0,14 ± 0,05 | 7,46± 0,41 | 28,00 ± 8,37 | 64,00 ± 19,49 |
| Desafiado com <i>A. hydrophila</i> | | | | | | | | |
| C BAC | 24,09 ± 0,92 | 5,21± 0,78 | 0,04 ± 0,05 | 0,51 ± 0,44 | 0,10± 0,03 | 7,23 ± 0,42 | 28,00 ± 8,37 | 54,00 ± 11,40 |
| T1BAC | 24,04 ± 1,22 | 5,58 ± 0,61 | 0,04 ± 0,05 | 0,37 ± 0,43 | 0,12± 0,05 | 7,54 ± 0,48 | 28,00 ± 8,37 | 68,00 ± 30,33 |
| T2BAC | 24,35 ± 0,99 | 5,03 ± 0,77 | 0,04 ± 0,05 | 0,54 ± 0,48 | 0,14± 0,07 | 7,35 ± 0,48 | 26,00 ± 5,48 | 56,00 ± 15,17 |
| T3BAC | 24,17 ± 0,83 | 5,22 ± 0,88 | 0,07 ± 0,05 | 0,90 ± 0,72 | 0,11± 0,03 | 7,33 ± 0,58 | 32,00 ± 4,47 | 50,00 ± 14,14 |
| T4BAC | 24,19 ± 0,86 | 5,26 ± 0,69 | 0,02 ± 0,04 | 0,64± 0,53 | 0,11± 0,03 | 7,11 ± 0,51 | 34,00 ± 5,48 | 60,00 ± 15,81 |

Físico - Temperatura -T (°C); Químicos - OD (mg.L⁻¹); NH₃ (mg.L⁻¹); NH₄⁺ (mg.L⁻¹); Salinidade -S (%), pH, Alcalinidade - (A) (mg.L⁻¹ CaCO₃), Dureza-(D) (mg.L⁻¹ CaCO₃). OD – Oxigênio dissolvido; NH₃ – Amônia não ionizada; NH₄⁺- Íon amônio. Controle C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3,0, com 0,5 % extrato de erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate).

Buscando analisar o efeito da suplementação de ração com extrato etanólico de erva-mate sobre o crescimento dos animais, foram mensurados os parâmetros zootécnicos, e analisados estatisticamente com ANOVA de uma via. Como pode ser observado na tabela 6, a suplementação da ração com extrato de erva-mate não influenciou os parâmetros zootécnicos dos animais.

Por outro lado, foram observadas alterações quanto à sobrevivência dos peixes. Os grupos controle (desafiado e não desafiado) apresentaram 100% de sobrevivência. Já nos grupos tratados com erva-mate (desafiado e não desafiado) foram observadas mortalidades. Nos grupos não desafiados a sobrevivência foi de 90% (T1, T2 e T3) e 100% (T4) enquanto nos grupos desafiados foi observado 100% (T1 e T4), 90% (T2) e 80% (T3) de sobrevivência.

Tabela 6. Parâmetros zootécnicos de *O. niloticus* desafiado com *A. hydrophila* tratadas com suplementação da ração em diferentes concentrações de erva-mate.

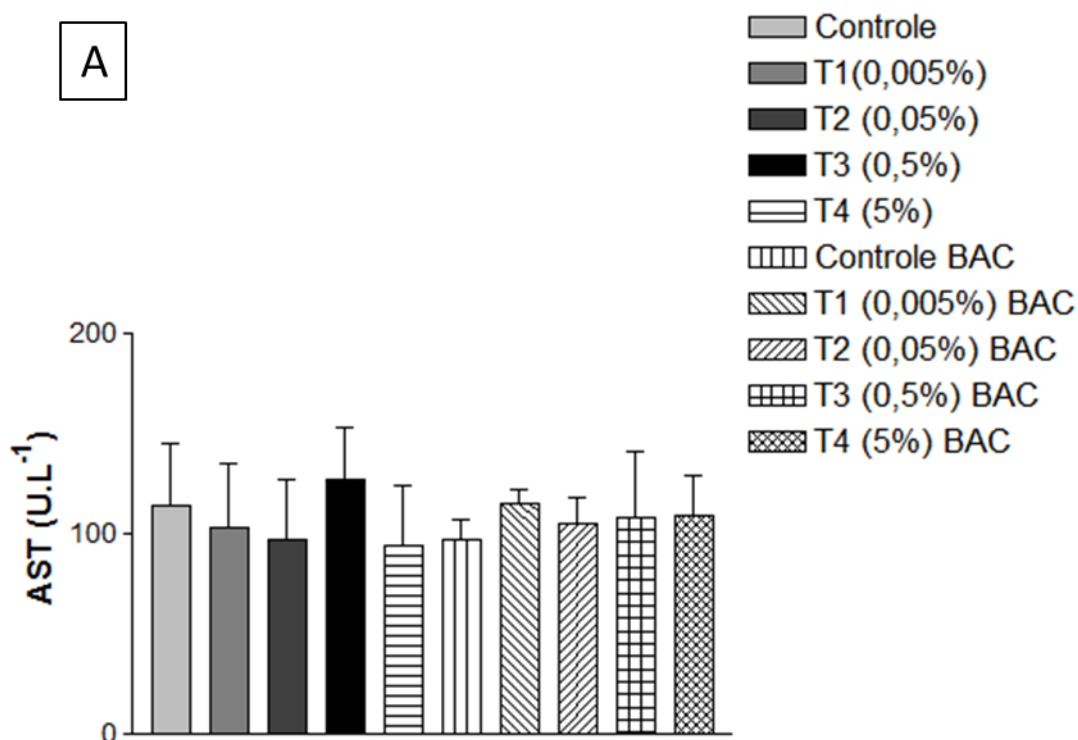
| | Não desafiado | | | | | Desafiado com <i>A. hydrophila</i> . | | | | |
|------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| | C | T1 | T2 | T3 | T4 | C BAC | T1 BAC | T2 BAC | T3 BAC | T4 BAC |
| TS | 100 | 90 | 90 | 90 | 100 | 100 | 100 | 90 | 80 | 100 |
| GP | 2,13 | 2,11 | 1,62 | 1,58 | 1,04 | 1,87 | 1,69 | 0,11 | 0,36 | 1,23 |
| FC | 634,70 | 663,87 | 626,19 | 587,71 | 563,60 | 593,74 | 671,67 | 541,54 | 509,36 | 551,57 |
| PI | 10,96 ± 2,47 | 11,31 ± 2,39 | 10,71 ± 2,66 | 11,29 ± 2,53 | 10,08 ± 2,08 | 10,94 ± 2,25 | 10,58 ± 2,57 | 9,75 ± 2,67 | 10,59 ± 2,57 | 10,27 ± 1,76 |
| PF | 22,04 ± 6,78 | 23,71 ± 6,83 | 21,56 ± 7,06 | 19,26 ± 7,36 | 18,31 ± 5,79 | 19,44 ± 4,42 | 24,23 ± 4,27 | 18,08 ± 4,25 | 16,56 ± 4,51 | 18,27 ± 6,83 |
| CPI | 8,15 ± 0,61 | 8,24 ± 0,79 | 8,41 ± 0,71 | 8,45 ± 0,79 | 8,61 ± 0,83 | 8,145 ± 0,67 | 8,31 ± 0,70 | 8,13 ± 0,82 | 8,20 ± 0,84 | 8,19 ± 0,60 |
| CPF | 8,47 ± 0,98 | 8,54 ± 0,85 | 8,39 ± 0,85 | 8,02 ± 1,12 | 7,71 ± 1,04 | 8,16 ± 0,75 | 8,90 ± 0,46 | 8,52 ± 1,04 | 13,46 ± 21,19 | 8,19 ± 1,12 |
| CTI | 6,62 ± 0,58 | 6,78 ± 0,57 | 9,58 ± 13,06 | 9,64 ± 13,04 | 6,89 ± 0,56 | 6,55 ± 0,56 | 6,79 ± 0,63 | 6,50 ± 0,67 | 6,66 ± 0,64 | 6,54 ± 0,35 |
| CTF | 10,42 ± 0,97 | 10,72 ± 0,95 | 10,33 ± 1,20 | 9,84 ± 1,32 | 9,74 ± 1,25 | 9,82 ± 1,29 | 10,82 ± 0,72 | 10,01 ± 1,16 | 9,75 ± 1,20 | 9,94 ± 1,22 |
| HI | 2,57 ± 0,32 | 2,42 ± 0,22 | 2,53 ± 0,27 | 2,51 ± 0,27 | 2,49 ± 0,26 | 2,43 ± 0,24 | 2,52 ± 0,23 | 2,52 ± 0,26 | 2,53 ± 0,27 | 4,51 ± 6,55 |
| HF | 3,35 ± 0,60 | 3,45 ± 0,39 | 3,45 ± 0,38 | 3,27 ± 0,53 | 3,05 ± 0,48 | 3,35 ± 0,38 | 3,55 ± 0,33 | 3,28 ± 0,36 | 3,07 ± 0,43 | 3,15 ± 0,64 |

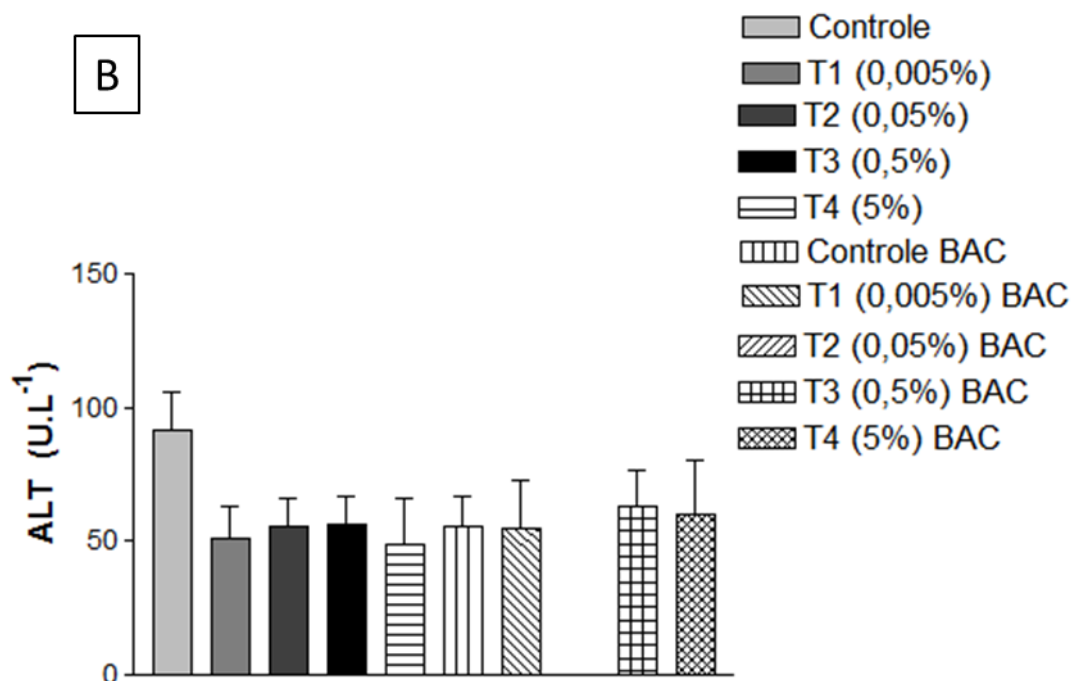
Taxa de Sobrevivência em % (TS); Ganho de Peso em g (GP); Fator de Condição (FC); Peso Inicial em g (PI); Peso Final em g (PF), Comprimento Padrão Inicial em cm (CPI); Comprimento Padrão Final em cm (CPF); Comprimento Total Inicial em cm (CTI) Comprimento Total Final em cm (CTF); Altura Inicial em cm (HI); Altura Final em cm (HF); Controle C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3, com 0,5 % extrato de erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate). Os valores são expressos como média ± DP; n=20 para cada tratamento.

5.2.2. Análises metabólicas

Como pode ser observado na figura 14 não houve diferença significativa para as atividades da AST e ALT plasmática. A atividade das enzimas AST e ALT tem importância no metabolismo de aminoácidos nas células, porém o aumento de atividade destas enzimas no sangue está diretamente associado a qualquer lesão (injúria) tissular ou hepatocelular de qualquer etiologia ou doença afetando o parênquima hepático que liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sanguínea (THRALL et al., 2015). A ausência de variação da atividade destas enzimas no plasma sanguíneo dos grupos experimentais indica que a suplementação com extrato de erva-mate não causou dano celular.

Figura 14. (A) Atividade da enzima AST (U.L^{-1}), (B) Atividade da enzima ALT (U.L^{-1}) no plasma de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; $n=20$ para cada tratamento.



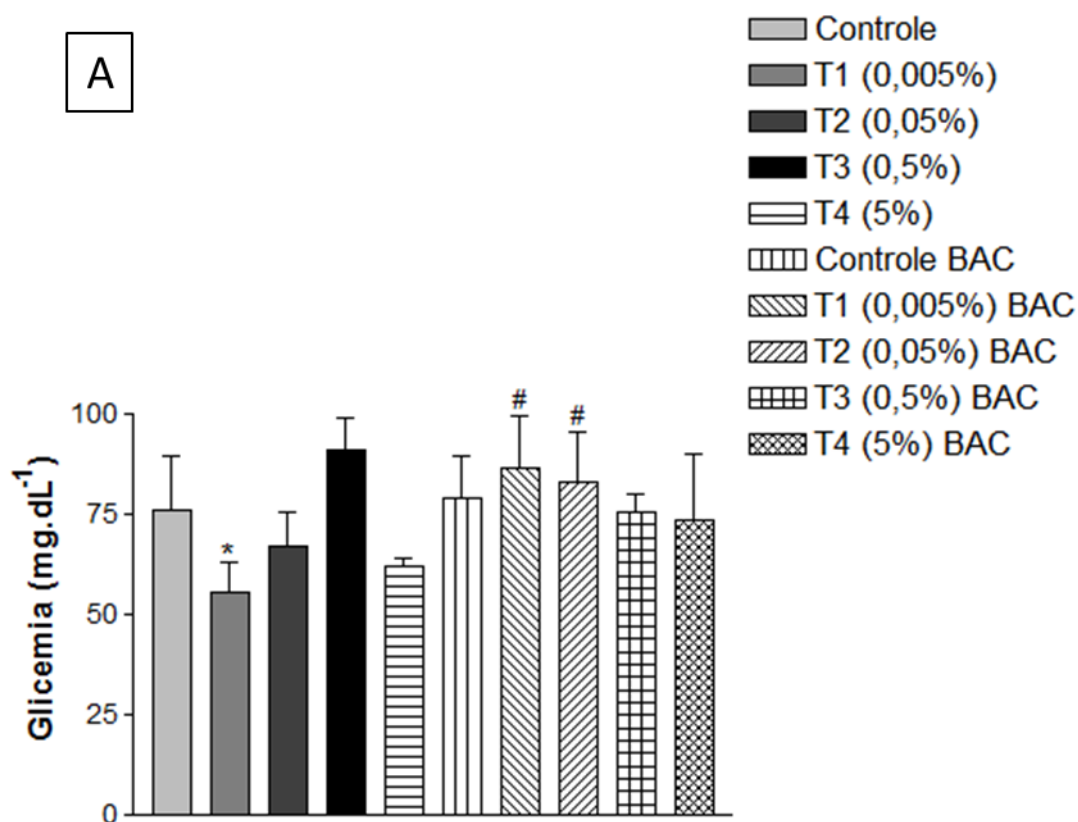


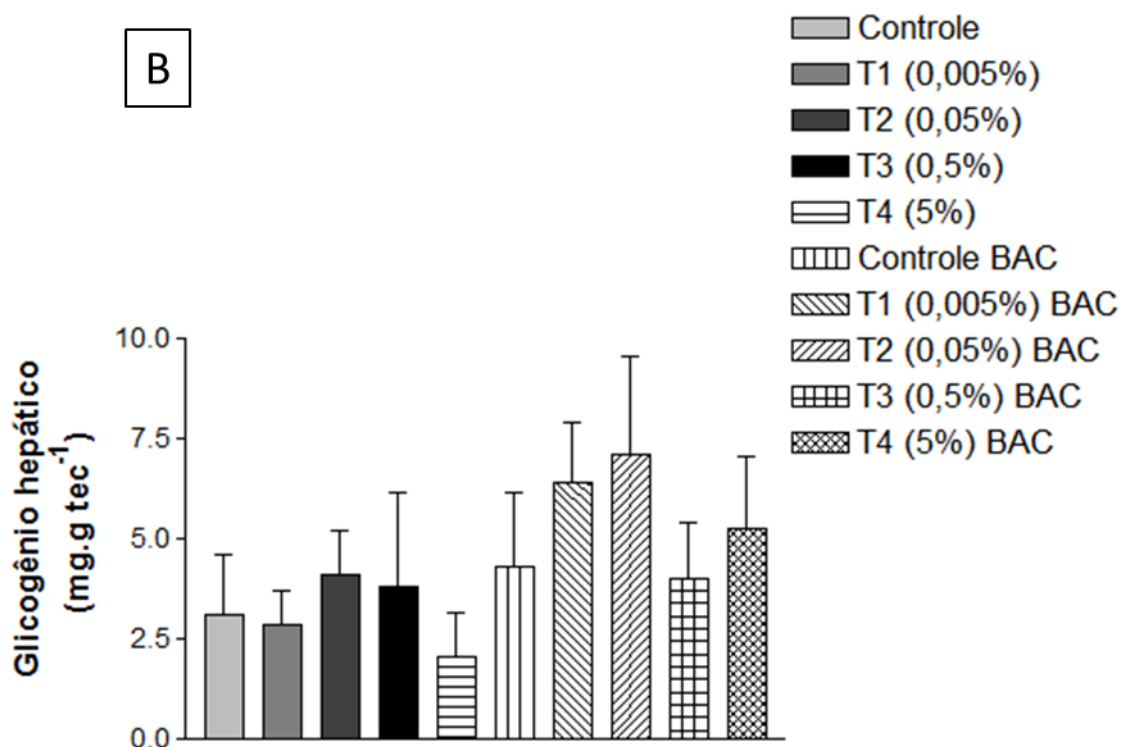
No presente trabalho, os valores obtidos para atividade da AST e ALT são mais altos do que os relatados na literatura. Nos trabalhos desenvolvidos por Abdel-Khaleket al., (2015), Abdl-Khalek et al., (2017) com *O. niloticus* os valores basais encontrados para as atividades da AST variaram entre 16U/L e 30 U/L e para ALT foram de 28 U/L e 50 U/L. Estas diferenças podem estar relacionadas ao tamanho dos animais, idade, sexo e condições fisiológicas durante os experimentos. Comparativamente, os valores de ALT (Figura 14B) estão mais próximos aos encontrados na literatura, o que pode ser considerado positivo, pois a atividade plasmática da ALT está diretamente ligada a dano hepático, não sendo observado tal fato no presente trabalho nas diferentes concentrações de extrato de erva-mate, nem relacionado ao desafio com *A. hydrophila*.

Outra fonte de energia para os peixes além das proteínas é o metabolismo de carboidratos (JURSS, BASTROP, 1995). O metabolismo de carboidratos varia de acordo com o estado fisiológico do animal, onde a glicemia é uma análise importante, pois seu aumento (hiperglicemia) está associado a situações estressantes ou doenças (CAMPBELL, 2015). Durante essas duas situações os peixes teleósteos mobilizam suas reservas de glicogênio, para catabolizá-lo em glicose. Além da glicemia, o conteúdo de glicogênio é considerado outra análise importante como marcador de condição fisiológica dos peixes (CAMPBELL, 2015).

Na figura 15, são apresentados os níveis de glicemia (figura 14A) e de conteúdo de glicogênio no fígado (figura 15B) das tilápias suplementadas com erva-mate e desafiadas ou não com *A. hydrophila*. Houve diferença significativa da glicemia entre o grupo controle basal e T1 (0,005% extrato de erva-mate) e foi observado que nos grupos desafiados T1 e T2 houve um aumento significativo da glicemia quando comparado aos respectivos grupos não desafiados, T1 e T2 (0,05% extrato de erva-mate). Ainda, o controle BAC desafiado não apresentou diferença significativa comparado ao demais grupos suplementados com erva-mate desafiado e não desafiado.

Figura 15. (A) Níveis de glicemia (mg.dL^{-1}) e (B) conteúdo de glicogênio ($\text{mg de glicogênio.g de tecido hepático}^{-1}$) de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. * estatisticamente diferente do controle não desafiado ($p < 0,05$), # estatisticamente diferente da respectiva concentração não desafiada ($p < 0,05$).





O controle basal para glicemia apresentou valor de $76,26 \pm 13,15 \text{ mg.dL}^{-1}$, sendo este valor próximo ao encontrado para *O. niloticus* na literatura, que variou de 40 a 60 mg.dL^{-1} (ABDEL-KHALEK et al., 2015; BIZARRO et al., 2013; SANTOS et al., 2006). O presente estudo realizou a eutanásia de todos os animais uma hora após a última alimentação para todos os tratamentos, portanto os animais se encontravam no período pós-prandial de glicemia que se estende até 2 horas após alimentação, sendo essa a causa dos valores um pouco mais altos, quando comparados aos valores da literatura.

Houve diferença significativa entre o grupo controle basal e T1 (0,005% extrato de erva-mate), onde foi observado uma redução da glicemia no grupo tratado. Além disso, foi observado que nos grupos desafiados T1 e T2 houve um aumento significativo da glicemia quando comparado aos respectivos grupos não desafiados, T1 e T2, indicando que a presença da bactéria provocou uma resposta de estresse nos animais (comprovando a infecção) que não foi prevenida/combateda pelo extrato de erva-mate. Segundo Castro et al., (2008), ocorreu um aumento no nível de glicose e cortisol em tilápias desafiadas com a bactéria *Streptococcus agalactiae* em tanques-rede, sendo que a glicemia foi de 55

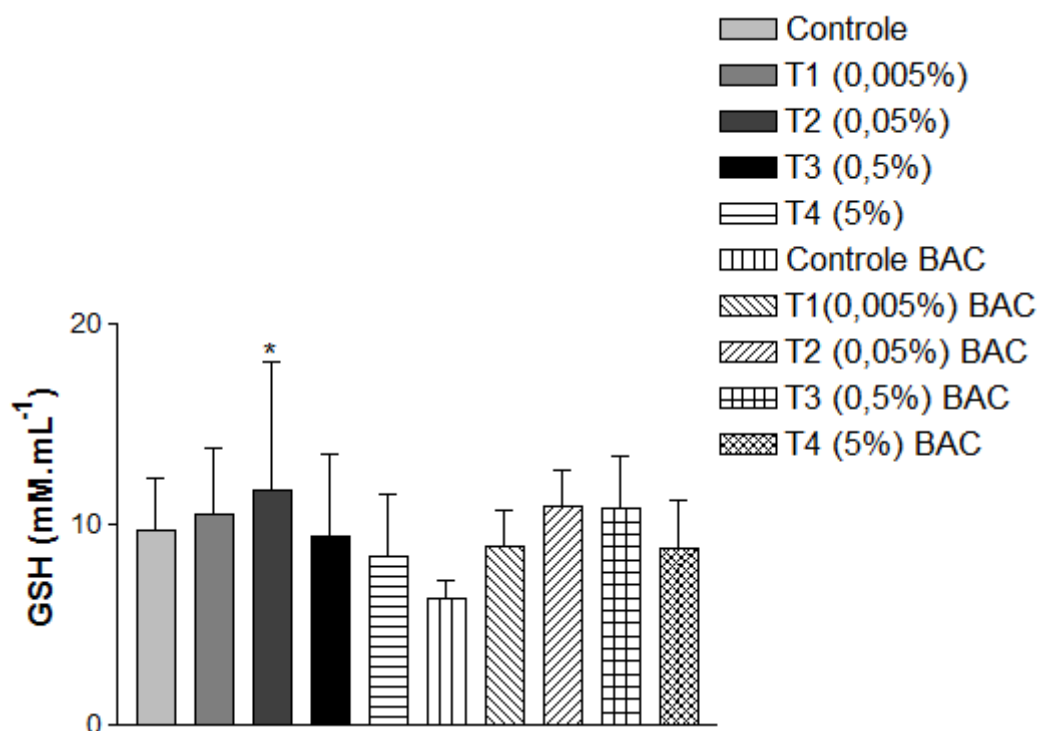
$\pm 10 \text{ mg.dL}^{-1}$ (controle não desafiado) para $90 \pm 17 \text{ mg.dL}^{-1}$ (controle desafiado com a bactéria). Ocorreu um quadro de hiperglicemia nos grupos T1-BAC e T2-BAC, estando em consonância com o trabalho de Castro et al., (2008).

Além da glicemia, também foi avaliado o conteúdo hepático de glicogênio. O controle basal apresentou valor de glicogênio hepático $2,74 \pm 1,93 \text{ mg de glicogênio.g de tecido}^{-1}$ próximo a valores observados para o jundiá (*Rhamdia quelen*) 3 a 4 mg.g tecido^{-1} (De Amorim, 2016). Por outro lado, os valores ficaram bastante distantes dos relatados para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) 1 a 5 $\text{g de glicogênio}^{-1}.100\text{g de tecido}^{-1}$ (OLIVEIRA et al., 1997) e para *O. niloticus* 0,00825 $\text{g de glicogênio}^{-1}. 100 \text{ g}^{-1}$ de tecido⁻¹ por Navarro, (2010) segundo metodologia de CARROLL, LONGLEY, ROE et al., (1956). As variações da concentração de glicogênio encontradas na literatura para diferentes espécies de peixes têm sido relacionadas com o modo de vida do animal, estágio de desenvolvimento gonadal, estação do ano e sexo (OLIVEIRA et al., 1997).

Sabe-se que as condições de cultivo influenciam no equilíbrio fisiológico dos animais e qualquer condição ou injúria que altere a sua homeostasia pode provocar um aumento da produção de espécies reativas que levam ao processo de estresse oxidativo celular danificando membranas, proteínas e DNA e podendo levar à morte das células (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). A fim de avaliar se o desafio com *A. hydrophila* e a suplementação com erva-mate na ração influenciaram no sistema de defesas antioxidantes e nos danos oxidativos aos tecidos dos peixes, foram avaliadas as atividades das enzimas glutathione transferase (GST), catalase (CAT), o conteúdo de glutathione reduzida, a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas.

No presente trabalho a concentração basal de GSH (Figura 16) está dentro da faixa proposta pela literatura que varia 7 a 40 mM.mL^{-1} , para *O. niloticus* (ABDEL-KHALEK et al., 2017; ABDEL-KHALEK, 2015; PINER, UNERB, 2013). O aumento na concentração de GSH em T2(0,05% extrato de erva-mate), comparado ao controle é positivo pois a GSH tem função primordial na neutralização das espécies reativas de oxigênio, mas esse aumento não ocorreu nas demais concentrações.

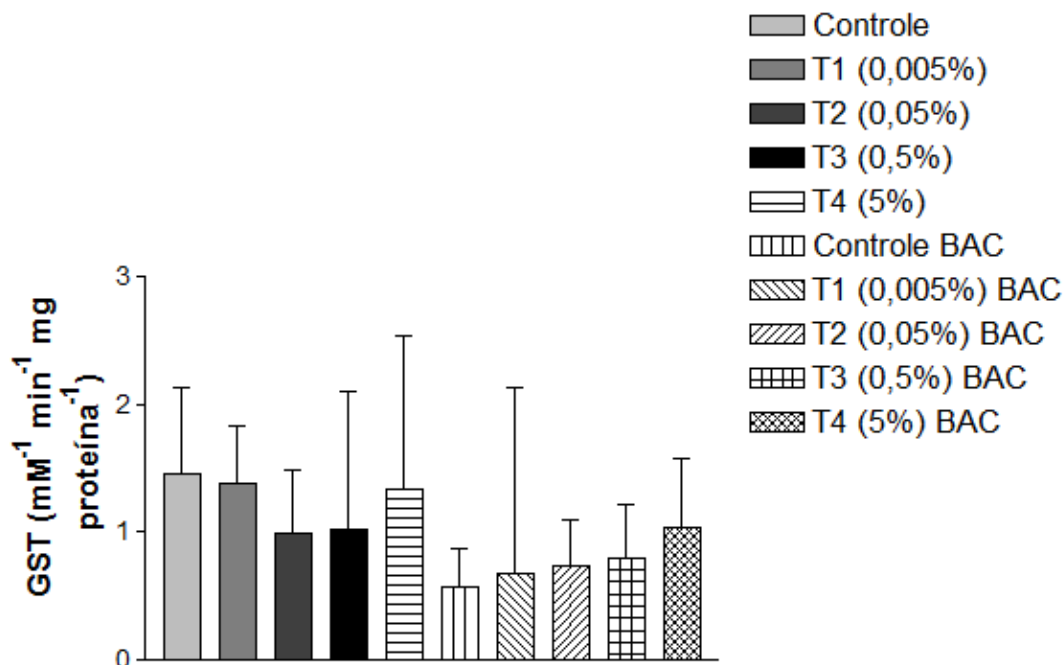
Figura 13. Concentração de glutathione reduzida total (GSH) em mM.mL^{-1} no fígado de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; n=20 para cada tratamento. * estatisticamente diferente do controle não desafiado $p < 0,05$.



Segundo Meister, Anderson, Ann, (1983) a glutathione atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular, sendo que a glutathione existe no organismo em duas formas a reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Durante uma situação de estresse oxidativo é necessário a rápida neutralização das espécies reativas de oxigênio, sendo essa tarefa realizada, entre outras estratégias, pela glutathione na sua forma reduzida, passando para sua forma oxidada, e com a espécie reativa de oxigênio neutralizada. Logo, quando ocorre um aumento na concentração da glutathione reduzida-GSH no sistema antioxidante este aumento considerado como um fator positivo (HALL, MALIA, 1986). Porém, a não manutenção dos níveis de GSH nos demais tratamentos, na presença ou ausência de infecção por *A. hydrophila*, não confirma um efeito modulador da erva-mate.

Considerando a ação da glutathione nas células, foi avaliada a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) (Figura 17). Esta enzima é responsável pela conjugação da glutathione com outras moléculas no processo de destoxificação de xenobióticos (ROVER JÚNIOR, HOEHR, VELLASCO, 2001).

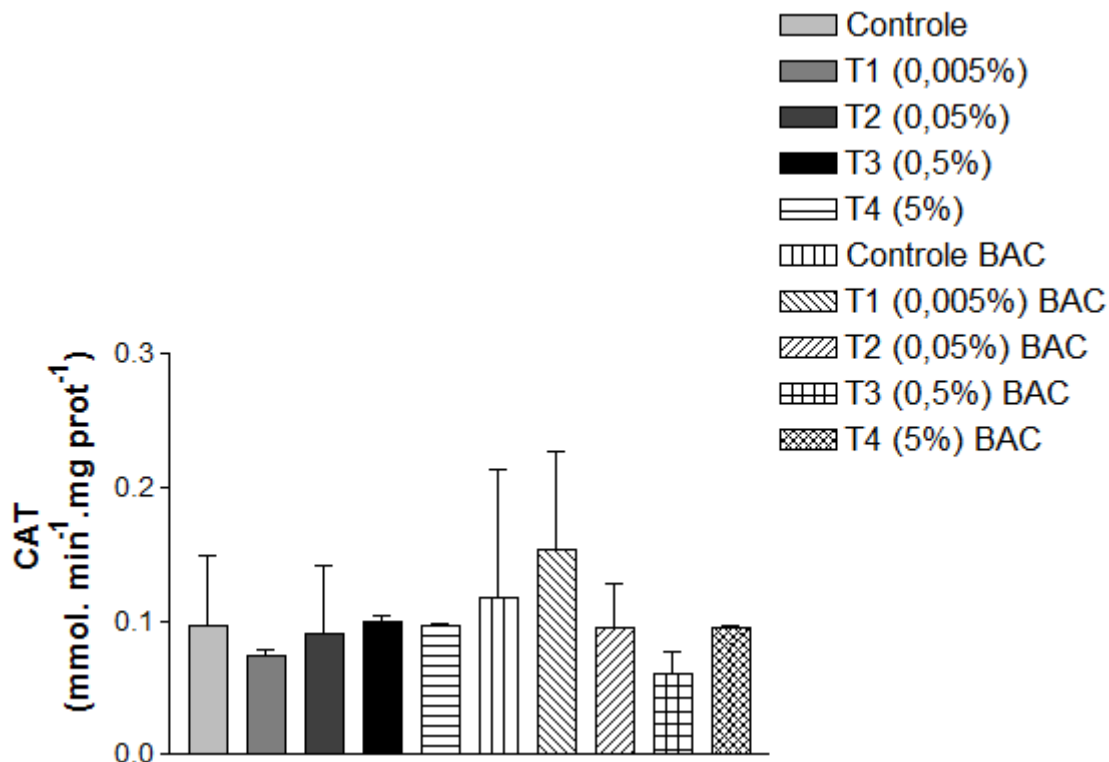
Figura 14. Atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) em $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$ no fígado de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; $n=20$ para cada tratamento.



Os valores basais de atividade da enzima GST encontrados se mostraram divergentes/superiores aos valores encontrados na literatura (PINER, NEVIN, 2013; MALACHY et al., 2018) para *O. niloticus*. Essa variação pode ocorrer pelos diferentes métodos de quantificação da atividade da enzima GST. No presente trabalho como verificado na figura 16 não houve alteração da atividade enzimática da GST nos diferentes grupos de tratamentos, podendo indicar uma falta de efeito modulador do sistema antioxidante da suplementação com erva-mate.

Outra enzima do sistema antioxidante que desempenha papel fundamental é a catalase (CAT). Como pode ser observado na figura 18 não foram encontradas variações na sua atividade. Esta enzima é responsável pela neutralização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) convertendo-o em oxigênio e água. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é considerado uma espécie reativa potencialmente danosa, pois pode gerar o radical hidroxil, a espécie reativa de oxigênio mais danosa aos sistemas biológicos (PINER, NEVIN, 2013).

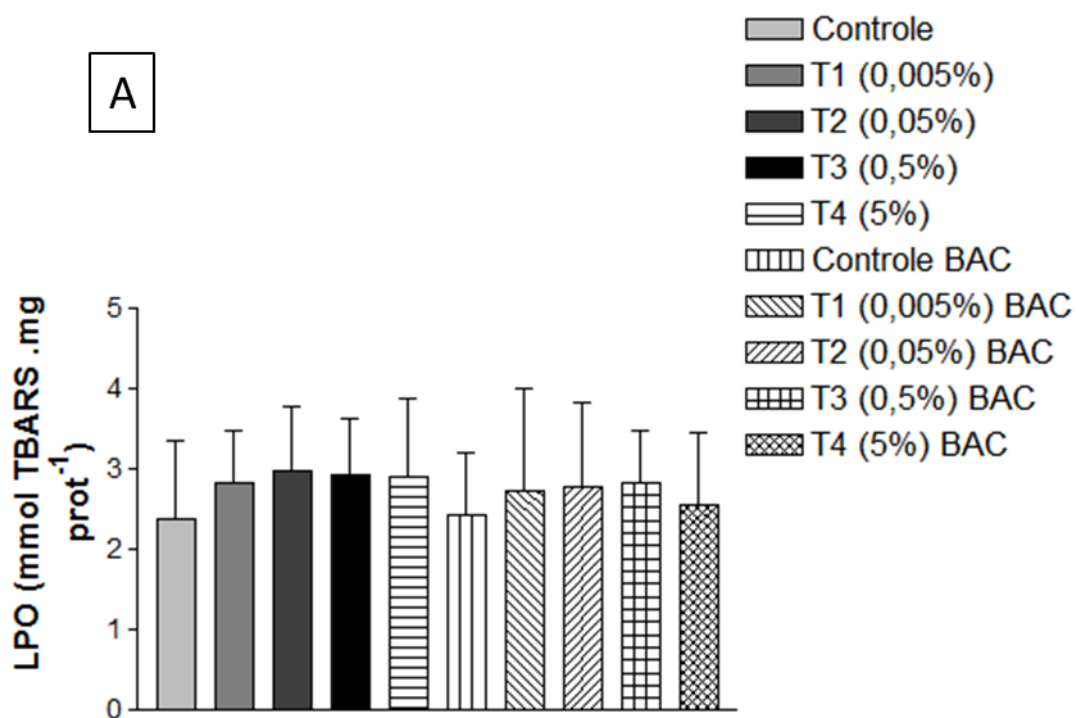
Figura 15. Atividade da enzima Catalase (CAT) em $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$ no fígado de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; $n=20$ para cada tratamento.

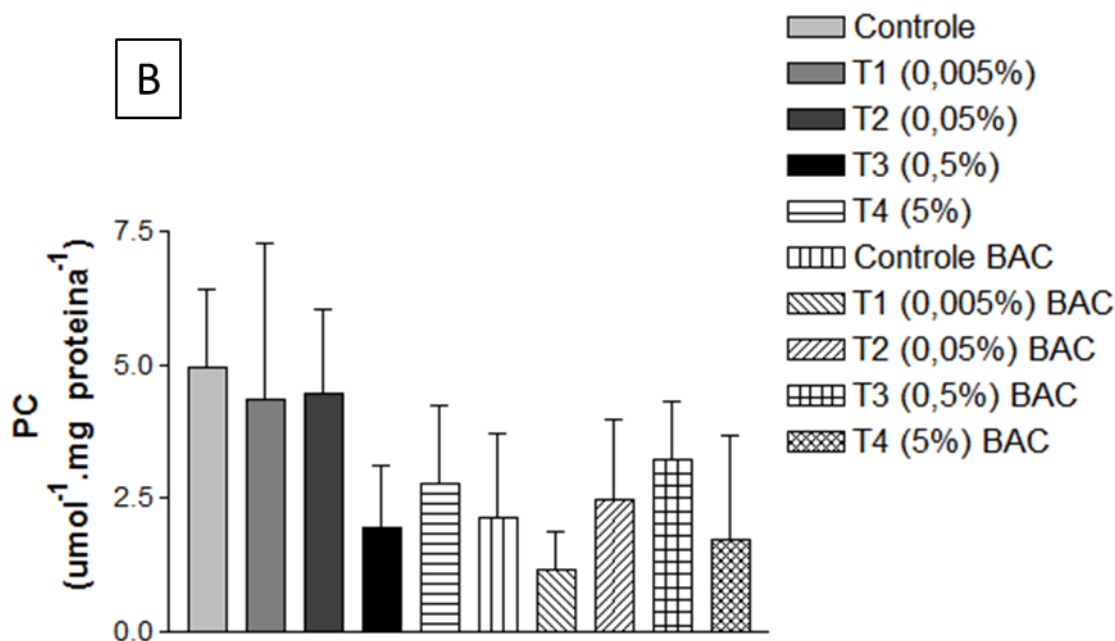


A atividade basal da catalase observada nessa pesquisa de $0,09 \pm 0,05 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$, estando esse valor próximo a faixa encontrada na literatura para *O. niloticus* ($0,032$ a $0,06 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}$ de proteína $^{-1}$) (ABDEL-KALEK et al., 2015; ABDEL-KALEK et al., 2017; ABDEL-TAWWAB et al., 2018; GOBI et al., 2016; GHAFARI et al., 2017; MALACHY et al., 2018). Segundo Gobi et al., (2016), o aumento na atividade da catalase é proporcional ao aumento do tempo de suplementação, como observado em estudo com suplementação de extrato etanólico de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em *Oreochromis mossambicus*. Diante deste dado, é possível sugerir que se realize um estudo da suplementação com erva-mate em tilápias por um maior período de tempo, pois no período estudado, no presente trabalho, não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações de suplementação com a erva-mate e nem entre os grupos desafiados e não desafiados em relação à atividade da catalase no fígado.

O estresse oxidativo pode danificar o DNA da célula, a bicamada lipídica que constitui as membranas celulares e as mais diversas proteínas presentes na célula. Para mensuração do dano oxidativo ocorrido nas células utiliza-se a mensuração dos produtos resultantes do processo de oxidação (PINER, NEVIN, 2013). Mensurado o dano oxidativo através da medida da Lipoperoxidação (LPO) e dos níveis de proteína carbonilada (PC) (Figura 19).

Figura 16. (A) Determinação da Lipoperoxidação - LPO em $\text{mmol de TBARS}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ e (B) Determinação da Proteína Carbonilada - PC em $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ no fígado de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; $n=20$ para cada tratamento.





Como pode-se observar na figura 19 não houve diferença significativa na concentração de proteína carbonilada e nos níveis de lipoperoxidação. Os valores de LPO estão dentro da faixa encontrada para *O. niloticus* que é de 0,5 a 6 mmol TBARS⁻¹.mg proteína⁻¹ (ABDEL-KHALEK et al., 2015; ABDEL-KHALEK et al., 2017; ABDEL-TAWWAB, et al., 2018). Segundo Ferreira, Matsubara, (1997) a lipoperoxidação é um processo no qual ocorre a oxidação das cadeias de ácidos graxos polinsaturadas, a membrana é mais afetada o que acarreta em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares devido à ação dos radicais livres. Como consequência, ocorre a perda das funções exercidas pela membrana plasmática, como seletividade e transporte podendo gerar até mesmo extravasamento do conteúdo de certas organelas (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). No presente trabalho foi possível observar que não houveram alterações nos níveis de lipoperoxidação em nenhum dos grupos experimentais, indicando que tanto a presença da bactéria no desafio quanto a suplementação com erva-mate não foram capazes de induzir mudanças no estado redox das células.

Para a proteína carbonilada, De Miranda, (2013) encontrou o valor basal de 0,010 nmol proteína carbonilada⁻¹.mg proteína⁻¹ em Curimbata (*Prochilodus lineatus*). Já Martins, (2016) encontrou valores de proteína carbonilada de 5 a 15 nmol proteína carbonilada⁻¹ mg proteína⁻¹ em carpa (*Cyprinus carpio*), demonstrando uma ampla faixa

entre as espécies teleósteas. Como definido por Levine et al., (1990) a formação e a presença de espécies reativas de oxigênio no interior celular pode provocar a carbonilação de proteínas. Durante esse processo ocorre a modificação de cadeias laterais de aminoácidos formando grupamentos do tipo carbonila (como aldeídos e cetonas). No presente trabalho foi possível observar que não houve alterações nas concentrações de proteína carbonilada em nenhum dos grupos experimentais, indicando que tanto a presença da bactéria no desafio quanto à suplementação com erva-mate não foram capazes de induzir mudanças no estado redox das células.

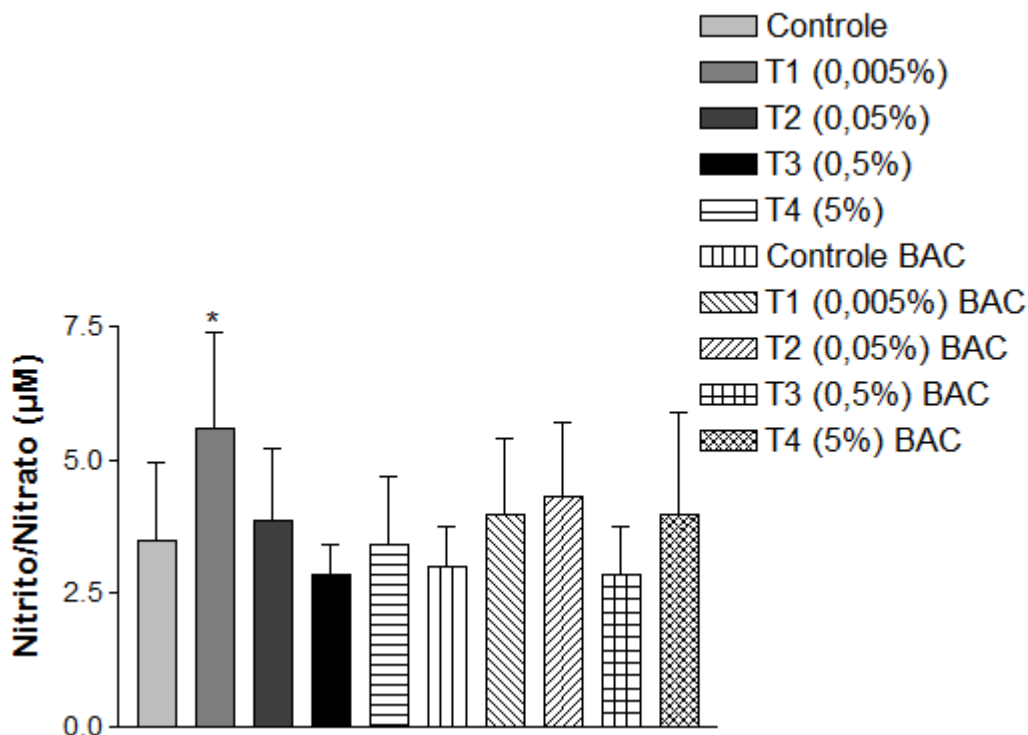
5.2.3. Sistema imune e hematológico

Além do metabolismo de carboidratos e de proteínas, o sistema imune também desempenha papel essencial para manutenção da homeostase celular. A fim de avaliar se a suplementação com erva-mate e/ou o desafio com *A. hydrophila* influenciaram o funcionamento da resposta imune nos peixes foram analisados o conteúdo de nitrito e nitrato no rim e a atividade da lisozima no rim e no sangue dos peixes.

No presente trabalho foi avaliado o conteúdo de nitrito/nitrato que estão apresentados na figura 20. Houve aumento das concentrações de nitrito/nitrato entre o T1 (0,005% de extrato de erva-mate) não desafiado em relação ao grupo controle não desafiado. Logo, o aumento da concentração de nitrito/nitrato no tratamento não desafiado sugere um aumento da síntese de NO e aumento da capacidade de resposta imune dos animais tratados com erva-mate.

Figura 17. Conteúdo de Nitrito/Nitrato em μM no rim de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os

valores são expressos como média \pm DP; n=20 para cada tratamento. * estatisticamente diferente do controle não desafiado ($p < 0,05$).

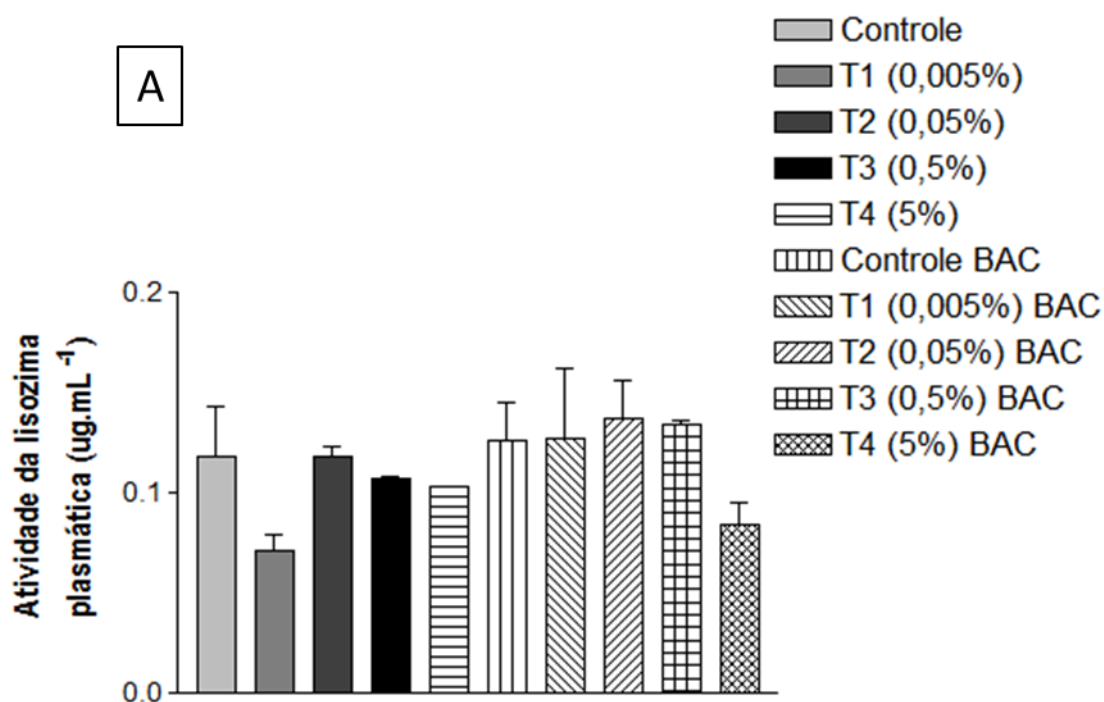


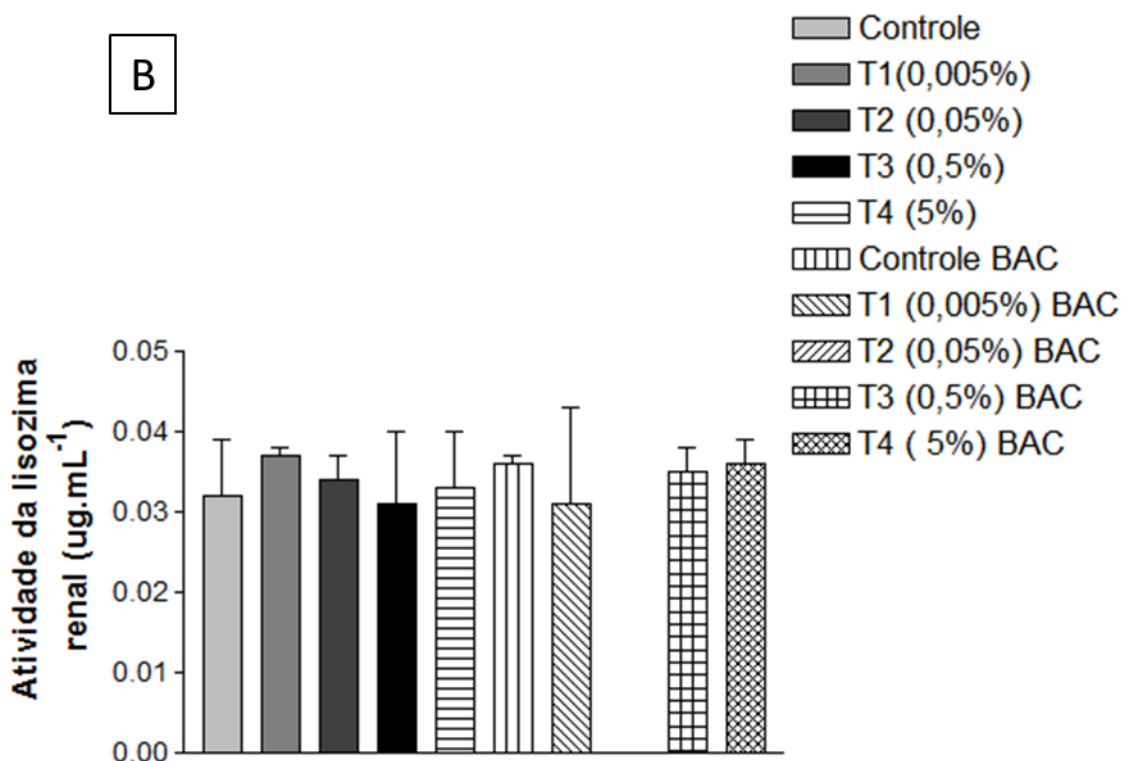
Os valores de conteúdo de nitrito/nitrato são bastante variáveis dependendo da espécie de peixe teleosteo considerada (STAFFORD et al., 2002). Segundo Acosta, (2005) os valores de nitrito apresentado por juvenis de *Carassius auratus* (goldfish) variaram de 5 µM (valores basais) a 35 µM (valores de animais vacinados para a bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) demonstrando a capacidade de resposta do sistema imune frente à patógenos. Para *O. niloticus* os valores basais encontrados na literatura são bem mais baixos de 0,0075 µM a 0,3 µM (GOBI et al., 2016).

No trabalho de Gobi et al, (2016) ao analisar o nitrito como resposta imunológica de *Oreochromis mossambicus* suplementada com extrato etanólico de *Psidium guajava* L., desafiada com *Aeromonas hydrophila* encontrou um aumento da concentração de nitrito com o passar do tempo. Os pesquisadores realizaram três coletas com 10, 20 e 30 dias de suplementação, e o seu melhor resultado foi de 0,12 µM de nitrato aos 30 dias. No presente trabalho o aumento estatisticamente significativo na concentração de nitrito/nitrato $5,59 \pm 1,81 \mu\text{M}$ foi obtido no grupo T1 não desafiado após 25 dias de suplementação e cinco dias de desafio com suplementação, totalizando 30 dias de experimento.

Além do óxido nítrico (medido indiretamente pelo conteúdo de nitrito/nitrato), outro componente importante da resposta imune é a atividade da lisozima, sendo uma das principais linhas de defesa contra doenças bacterianas. Conforme demonstrado na figura 20 os valores de atividade de lisozima não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos e o grupo controle desafiado e não desafiado tanto no rim quanto no plasma. O estudo de Balfry, Iwama, (2004) com salmão-prateado (*Oncorhynchus Kisutch*), identificou que os leucócitos são os principais produtores de lisozima, e que o tecido renal apresenta os maiores índices de atividade da enzima lisozima, devido à alta concentração de leucócitos presentes no interior do tecido hematopoiético do rim.

Figura 21. (A) Atividade da Lisozima em $\mu\text{g/mL}$ no plasma; (B) Atividade da enzima Lisozima em $\mu\text{g/mL}$ no rim de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; $n=20$ para cada tratamento.





Segundo Gobi et al., (2016) ocorre um aumento na atividade da lisozima proporcionalmente ao aumento do tempo de suplementação, sendo isso comprovado em estudo com suplementação com extrato etanólico de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em *Oreochromis mossambicus*, porém no presente trabalho (figura 21) não houve um aumento na atividade da lisozima tanto no rim como no plasma, indicando que o extrato de erva-mate nessas concentrações não tem interferência na resposta imune em condições basais e desafiadas com *A. hydrophila*, no período de tempo estudado.

Segundo Ranzani-Paiva, (2013) o sangue atua como transportador de substâncias dentro dos organismos, levando aporte de nutrientes até os tecidos periféricos e retirando os metabólitos dos tecidos periféricos encaminhando-os para a filtragem e/ou remoção. Ainda é responsável pelo transporte de oxigênio para as células através dos eritrócitos, sendo estes as células mais numerosas do sangue, responsáveis também pelo transporte do CO₂ para ser eliminado do organismo nas trocas gasosas nas brânquias. Além dos eritrócitos outro constituinte celular sanguíneo são os trombócitos responsáveis pela coagulação impedindo assim o extravasamento do sangue frente a uma lesão, e finalmente os constituintes do sistema de defesa, os leucócitos responsáveis pela localização e imobilização/destruição dos patógenos infecciosos.

Através do sangue é possível fazer diversas análises que demonstram as condições fisiológicas, bem como o diagnóstico de enfermidades (TAVARES-DIAS et al., 2009). Um aporte adequado de oxigênio aos tecidos é condição essencial para o bom funcionamento das células e conseqüentemente do organismo como um todo. A tabela 7 apresenta os dados hematológicos dos grupos experimentais suplementados com erva-mate e desafiados ou não com *A. hydrophila*.

No presente trabalho os valores basais estão dentro da faixa proposta para a espécie *Oreochromis niloticus*, segundo dados compilados por Tavares-Dias, Moraes (2004), que apresentam para eritrócitos valores de 1,31 a 2,47 $\times 10^6$. μL^{-1} , hemoglobina de 5 a 10 g.dL^{-1} , hematócrito de 18,5 a 32,5 %, VCM 246 a 118,6 fL, CHCM 20 a 33,8 g.dL^{-1} . Como pode ser observado não houve diferença estatisticamente significativa no hematócrito, na taxa de hemoglobina, nos índices CHCM e VCM entre os grupos de tratamento. Os valores de eritrócitos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os respectivos grupos desafiados e não desafiados, sendo que os tratamentos não desafiados apresentaram maior valor de eritrócitos. Ainda, houve diferença significativa entre o grupo T4 BAC (5 % extrato de erva-mate) (maior conteúdo de eritrócitos) e o respectivo controle BAC. Segundo Ranzani-Paiva et al., (2013), o quadro de diminuição do número de eritrócitos por causa desconhecida caracteriza anemia, assim no presente estudo associamos essa diminuição no número de eritrócitos ao desafio com a bactéria *A. hydrophila*.

A hemoglobina corpuscular média –HCM, indica o peso da hemoglobina na hemácia, determinando a quantidade de hemoglobina presente em cada eritrócito (RANZANI-PAIVA et al., 2013). No presente trabalho o HCM apresentou aumento em dois dos grupos desafiados, sendo eles: o controle BAC desafiado frente ao controle não desafiado, e o tratamento 2 (0,05% de extrato de erva mate) desafiado comparado ao tratamento 2 (0,05% de extrato de erva-mate) não desafiado. O aumento observado pode indicar um efeito adaptativo dos animais desafiados desses dois grupos, pois o aumento do HCM ocorreu nos mesmos grupos que ocorreu a diminuição estatisticamente significativa do número de eritrócitos. Segundo Tavares-Dias et al., (2004) os eritrócitos imaturos são denominados de reticulócitos e a quantidade de hemoglobina é variável de acordo com seu estágio de maturação, nos teleósteos ocorre um aumento do volume dos eritrócitos proporcionalmente ao aumento do estágio de maturação do mesmo (TAVARES-DIAS et al., 2004). Logo podemos sugerir que nos animais do controle BAC

e tratamento 2 desafiados ocorreu um aumento na quantidade de reticulócitos, comparado ao controle e tratamento 2 não desafiado.

Já o tratamento 5 (5% de extrato de erva-mate) desafiado ocorreu um aumento no número de eritrócito comparado ao controle BAC desafiado e uma diminuição do HCM, quando comparado ao controle BAC desafiado. Podendo indicar um efeito menos severo do desafio bacteriano com *A. hydrophila* sobre os animais deste grupo, devido a um efeito protetor da suplementação com erva-mate.

Tabela 7. Parâmetros hematológicos do sangue de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate.

| | Eritrócitos | Hemoglobina | Hematócrito | HCM | CHCM | VCM |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------|--------------|---------------------------|--------------|----------------|
| Não desafiados | | | | | | |
| C | 3,27 ± 0,22 | 8,15 ± 0,71 | 35,88 ± 4,91 | 24,73 ± 2,81 | 22,95 ± 4,53 | 110,25 ± 14,26 |
| T1 | 3,12 ± 0,27 | 8,49 ± 1,78 | 32,63 ± 6,84 | 29,05 ± 6,76 | 28,36 ± 5,24 | 99,79 ± 17,11 |
| T2 | 3,03 ± 0,43 | 9,23 ± 1,60 | 32,22 ± 4,27 | 29,45 ± 5,35 | 27,09 ± 5,56 | 113,22 ± 9,26 |
| T3 | 2,89 ± 0,40 | 9,14 ± 1,62 | 32,67 ± 7,28 | 32,67 ± 7,22 | 29,64 ± 5,35 | 107,87 ± 17,89 |
| T4 | 2,95 ± 0,39 | 9,76 ± 2,18 | 32,33 ± 9,79 | 33,54 ± 7,18 | 31,31 ± 6,64 | 101,72 ± 24,98 |
| Desafiados com <i>A. hydrophila</i> | | | | | | |
| C BAC | 1,97 ± 0,28* | 7,08 ± 1,21 | 29,80 ± 5,12 | 37,52 ± 8,78* | 26,94 ± 4,34 | 171,02 ± 6,94 |
| T1 BAC | 1,95 ± 0,44 [#] | 8,13 ± 0,56 | 40,00 ± 2,31 | 36,87 ± 4,27 | 22,82 ± 4,40 | 177,72 ± 13,33 |
| T2 BAC | 2,34 ± 0,38 [#] | 9,39 ± 1,84 | 34,80 ± 4,09 | 44,78 ± 9,37 [#] | 32,99 ± 4,35 | 162,61 ± 25,75 |
| T3 BAC | 2,28 ± 0,48 [#] | 7,63 ± 0,76 | 35,00 ± 8,37 | 34,49 ± 6,89 | 21,30 ± 5,28 | 125,69 ± 44,50 |
| T4 BAC | 2,87 ± 0,48 [@] | 7,68 ± 1,08 | 30,13 ± 7,85 | 27,68 ± 7,37 [@] | 27,13 ± 5,51 | 106,08 ± 9,17 |

Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$); Hemoglobina-Hb (g/dL); Hematócrito (Hm%); Hemoglobina Corpuscular Média-HCM (pg); Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média-CHCM (g/dL); Volume Corpuscular Médio-VCM (fL). n=20 para cada tratamento. BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. * estatisticamente diferente do controle não desafiado p <0,05. # estatisticamente diferente da respectiva concentração não desafiada p <0,05. @ estatisticamente diferente do Controle BAC p <0,05.

6.CONCLUSÕES

- *S. agalactiae* é resistente aos extratos hidroalcólicos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), alho (*Allium sativum*), eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e pinus (*Pinus elliottii*), testados *in vitro*.
- Nos estudos *in vitro*, *A. hydrophila* demonstrou ser sensível ao extrato hidroalcólico de *I. paraguariensis* demonstrando o potencial para uso *in vivo* desse extrato como agente antibacteriano.
- A suplementação da erva-mate na ração dos peixes e o desafio com *A. hydrophila* não influenciaram no desenvolvimento dos animais e não promoveram alterações na qualidade de água do meio de cultivo.
- A suplementação da erva-mate na ração dos peixes e o desafio com *A. hydrophila* não influenciaram no sistema imune dos animais.
- A suplementação da erva-mate na ração dos peixes não apresentou toxicidade hepática.
- A suplementação da erva-mate na ração dos peixes e o desafio com *A. hydrophila* influenciaram no metabolismo de carboidratos, ocorrendo um quadro de hiperglicemia.
- A suplementação da erva-mate na ração dos peixes e o desafio com *A. hydrophila* não influenciaram o sistema de defesa antioxidante dos animais.
- No que se refere às variáveis hematológicas, verificou-se anemia nos animais desafiados com *A. hydrophila*.
- Os resultados encontrados *in vitro* indicam potencial antibacteriano do extrato de erva-mate.
- A partir do exposto torna-se necessário mais estudos com relação aos métodos de extração da erva-mate e tempos e doses de suplementação aos peixes para se determinar o potencial antibacteriano *in vivo* da erva-mate.

7. REFERÊNCIAS

ABDELRAHIM, S.I. et al. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. **Fitoterapia**, v. 73, p. 713-715, 2002.

ABDEL-KHALEK, A.A. et al. Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress. **The Journal of Basic Applied Zoology**, v. 72, p. 435-777, 2015.

ABDEL-KHALEK, A. A. et al. Protective role of dietary *Spirulina Platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 99-104, 2017.

ABDEL-TAWWAB, M. et al. Protective role of dietary *Spirulina platensis* diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 99-104, 2017.

ABDEL-TAWWAB, M. et al. Antioxidative and immunostimulatory effect of dietary cinnamon nanoparticles on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and its susceptibility to hypoxia stress and *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 74, p. 19–25, 2018.

ABREU, J.S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura**. 2007. 123 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

ACOSTA, F. et al. Influence of vaccination on the nitric oxide response of gilthead seabream following infection with *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, p. 31-38, 2005.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AL-HARBI, A.H. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* \times *O. aureus*). **Aquaculture**, v. 464, p. 515-520, 2016.

ALTINOK, I. et al. Protection of rainbow trout against yersiniosis by lpxD mutant *Yersinia ruckeri*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 55, p. 21-27, 2016.

ALTIERI, M. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 4. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004, 120 p.

ALY, S.M.; MOHAMED, M.F. Echinacea purpurea and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **The Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, p. 31-39, 2010.

AMMER, M.R. et al. Optimization of antibacterial activity of *Eucalyptus tereticornis* leaf extracts against *Escherichia coli* through response surface methodology. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. v. 9, p. 376-385, 2016.

ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants and varriers in Fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 281-307, 1992.

ASL, S.Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 134–1347, 2008.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**. Chichester: Ellis Horwood, 1987, p. 246- 269.

ABD-EL-RHMAN A.M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shell fish Immunology**, v. 27, p. 454–459, 2009.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997.

BALFRY, S.K.; IWAMA, G.K. Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 207-211, 2004.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoi & Gaimard), a South American Catfish. **Revista Aquicultura**, v. 32, p. 121-123, 2001.

BARA, M.T.F.; VANETTI, M.C.D. Estudo da atividade antimicrobiana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8, p. 22-34, 1998.

BARREIROS, A.L.B.; DAVID, G.M. Estresse oxidativo: Reação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BRASIL: MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília, 2011.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BARG, D. G. **Plantas tóxicas**. Instituto brasileiro de estudos homeopáticos. São Paulo, 2004.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVANS, D.H. **The physiology of fishes**. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. p. 215-242.

BERRIDGE, B.R. et al. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 165-173, 2001.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BITTENCOURT-JUNIOR, F.F., et al. Estudo da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da *Ilex paraguariensis*. **Interbio**, v. 6, p. 48-54, 2012.

BIZARRO, Y.W.S. **Efeito do fotoperíodo na glicemia, cortisol, parâmetros hematológicos e nos índices reprodutivos de machos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT**. 2013. 49 f. Dissertação de mestrado em ciências animais. Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2013.

CAMPBELL, T.W. Bioquímica Clínica dos Peixes e Anfíbios, In: THRALL, A., T., et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

CAPORAL, F.R. **Agroecologia: uma Nova Ciência para Apoiar a Transição a Agriculturas mais Sustentáveis**. 1. ed. Brasília:MDA, 2009, p. 30.

CASTRO, S.B.R. et al. Atividade antibacteriana de extratos de plantas do Brasil contra bactérias patogênicas para peixes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 756-760, 2008.

CARROLL N.V., LONGLEY R.W., ROE J.H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 220, p.583-593, 1956.

CHEN, H.Y.; YEN, G.C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L) leaves. **Food Chemistry**, v. 101, p. 686-694, 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline**. CLSI document M45-P [ISBN 1-56238-583-6].

Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

COELHO, K.D. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade e capacidade antioxidante de uma formulação em gel contendo o extrato das folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.). **Biomotriz**, v. 10, p. 136-155, 2016.

CONTE, L. **Produtividade e economicidade de tilapicultura em gaiolas na Região Sudoeste do Estado de São Paulo: estudos de casos**. 2002. 73f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

COGO, L.L. et al. Anti- helicobacter pylori activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 304-309, 2010.

COSTA, D.E.M.; RACANICCI, A.M.; SANTANA, Â.P. Atividade antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contra microrganismos isolados da carne de frango. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. 1-7, 2017.

COSTA, A.A.P. **Densidade de estocagem sobre o desempenho e estresse de juvenis de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede**. 2014, 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

COWAN, M.N. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-82, 1999.

CHU, W.; ZHUANG, X.; LU, C. Generation of *Aeromonas hydrophila* ghosts and their evaluation as oral vaccine candidates in *Carassius auratus* gibelio. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 48, p. 202-206, 2008.

DAMASCENO, D.C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, v. 5, p. 355-361, 2002.

DE ANDRADE, R.L.B. Custos de produção de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em um modelo de propriedade da região oeste do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, p. 198-203, 2005.

DE BIASI, B.; GRAZZIOTIN, A.E.H.; HOFMANN JR, A. E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* a. st.-hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 582-585, 2009.

DE MIRANDA, R.R. **Respostas biológicas de Prochilodus lineatus frente a nanopartículas agregadas de dióxido de titânio e óxido de zinco**. 2013. 64 f.

Dissertação (mestrado em Biologia Celular e Molecular), Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

DE AMORIN, D.G. **Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o sistema hematológico, imune e metabólico de jundiás *Rhamdia quelen* (Quoy&Gaimard, 1824).** 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável), Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2016.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABLKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v. 2, p. 110–112, 1991.

DÍAZ GONZÁLEZ, F.H.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006. 360p.

DOTTA, G. **Efeito imunomodulador dos extratos de própolis e *Aloe barbadensis*, suplementados na dieta de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*.** 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

DRAPIER, J.C.; WEIZESBIN, J.; HIBBS, J.B. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 18, p. 1587-1592, 1988.

DUNNILL, C. et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal**, v. 14, p. 89–96, 2017.

DUNZ, A.R.; SCHLIEWEN, U.K. Molecular phylogeny and revised classification of the haplotilapiine cichlid fishes formerly referred to as “Tilapia”. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 68, p. 64–80, 2013.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

ELLIS, A.E.; Lysozymeassays. In: STOLEN, J.S. et al. **Techniques in Fish Immunology.** USA: SOS publications, p. 101-103, 1990.

EMATER-PARANÁ. **Realidade Estadual da Piscicultura**, Curitiba-PR, 2005.

FANG, J.M.; SU, W.C.; CHENG, Y.S. Flavonoids and Stilbenes From Armand Pine. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1395-1397, 1988.

FAO, **The state of world fisheries and aquaculture 2010.** Food and agriculture organization of the united nations. Rome, 2010, p. 218.

FAO, **The state of world fisheries and aquaculture 2012.** Food and agriculture organization of the united nations. Rome, 2012, p. 230.

FAO, **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Food and agriculture organization of the united nations. Rome, 2014, 243 pp.

FAO, **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Food and agriculture organization of the united nations. Rome, 2016, p. 200.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415–430, 2007.

FEKIH, N. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 97-103, 2014.

FLETCHER, T.C.; WHITE, A. The lysozyme of the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 55, p. 207-210, 1976.

FENG, F.J.; HAN, S.J.; WANG, H.M. Genetic diversity and genetic differentiation of natural *Pinus koraiensis* populations. **Journal of Forest Research**, v. 17, p. 21–24, 2006.

FERNANDEZ, A.B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista Científica Internacional de Acuicultura**, v.16, p. 33-38, 2002.

FERNANDES, M.R.V. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39-44, 2014.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo: Artigo de Revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FIGUEIREDO, H.C.P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 678-680, 2006.

FIGUEIREDO, H.C.P., LEAL, C.A.G. Columnariose: Doença da Piscicultura Moderna. **Panorama da Aquicultura**, v. 17, p. 32-37, 2008.

FIOLO, K. et al. Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, p. 544-549, 2012.

- FLORES, P. et al. Ionic and osmotic effects of nitrate reductase activity in tomato seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, p. 552-557, 2000.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-71, 2000.
- GHAFAARI, H.G. et al. The protective role of vitamin E on *Oreochromis niloticus* exposed to ZnONP. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 1–7, 2017.
- GARCEZ, M. et al. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Salvador: Ulbra, Canoas, 2004. p.13-33.
- GASTALHO, S.; DA SILVA, G.J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa** v. 3, p. 27-41, 2014.
- GRAZIANI, A.C.; MELLO R.A. **Estudo da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcóólico de folhas verdes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. st.hil) in natura**. 2011. 100 f. Trabalho de Conclusão de Curso em Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2011.
- Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S. PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.
- GIRI, S.S. et al. Effect of *Guava* leaves on the growth performance and cytokine gene expression of *Labeorohita* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish Shellfish Immunology**, v. 46, p. 217-224, 2015.
- GLIESSMAN, S., R. **Agroecology: Ecological Processes in Sustainable Agriculture**. Flórida, EUA: Lewis/CRC Press, 1998, pp. 408.
- GHOSH, S. et al. The EJC Binding and Dissociating Activity of PYM Is Regulated in *Drosophila*. **PLOS Genetics**, v. 10, p.100-455, (2014).
- GOBI, N. et al. *Oreochromis mossambicus* diet supplementation with *Psidium guajava*L. Leaf extracts enhance growth, immune, antioxidant response and resistance to *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p. 572-583, 2016.
- GOLDENFARB, P.B. et al. Reproductibility in the hematology laboratory: the micro hematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GOMES, D.L.F. **Biomarcadores para Avaliação da Lesão Hepática Induzida por Fármacos**. 2014. 60 f. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Algarve: Faculdade de Ciências e Tecnologia, Faro- Portugal, 2014.

GONÇALVES, F.A. et al. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Litopenaeus kroyeri* (heller). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 11-15, 2008.

GROVE, D.C.; RANDALL, W. A. **Assay methods of antibiotics: a laboratory manual**. New York: Medical Encyclopedia, 1955, p.238.

GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1-27, 2008

GUZ, L.; KOZINSKA, A. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.) **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 48, p. 391-395, 2004.

GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. **Free Radical Research**, v. 19, p. 141-158, 1993.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130–7139, 1974.

HALL, R.; MALIA, R.G.; **Medical Laboratory Hematology**, London: Butterworths, 1986; p 294.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v.186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Clarendon, 2000, p. 200.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. Ed. Oxford: Clarendon; 2007, p. 851.

HARVEY, B.J., HOAR, M.S., **The theor and practice os induced breeding induce breeding in fish.** Ottawa, Canada: International Development Research Centre, p. 48, 1979.

HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A.A.; JOICE, G.J.C. Antibiotic resistance pattern of mobile *Aeromonads* from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 131-134, 2005.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 138-151, 2007.

HUSSEIN, S.A.M.; MOUSSA, I. Potential use of allicin (gaelic, *Allium sativum* Linn, essention oil) against fish pathogenic bacteria and its safety for monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 11, p. 696-699, 2013.

_____. IBGE. **Agricultura e Pecuária: Estatísticas Econômicas.** Comunicação Social. Setembro, 2016. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/9802-ppm-rebanho-bovino-alcanca-a-marca-recorde-de-215-2-milhoes-de-cabecas-mas-producao-de-leite-cai-0-4.html>. Acesso em: 12/02/2017.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish Immune System. **Fish Physiology**, v. 15, p. 311-337, 1996.

IWASHITA, M.K.P. et al. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, p. 60-66, 2015.

IMRAN, Q., M.; et al. Transcriptome profile of NO-induced Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative regulatory role in multiple biological processes. **Journal List Scientific Reports**, v. 8, p. 1-14, 2018.

JURS, K.; BASTROP, R. Amino acid metabolism in fish. In: HOCHACHKA, P.K.; MOMMSEN, P. (eds.), **Metabolic Biochemisry. Biochemistry and molecular biology of fishes.** Amsterdam: Elvier Science, p. 159-189, 1995.

JU, Y.R.; CHENB, W.Y.; LIAO, W.C. Model-based risk assessment for milkfish and tilapia exposed to arsenic in a traditional polyculture system with seasonal variations. **Aquacultural Engineering**, v. 62, p. 1-8, 2014.

KIM, S.Y. et al. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* L. leaves against oxidative stresses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 804-811, 2016.

KRISHNASWAMY, K.; ORSAT, V. Insight into the nanodielectric properties of gold nanoparticles synthesized from maple leaf and pine needle extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 131–136, 2015.

KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**. v. 4, p. 17-23, 1962.

KLOSTERHOFF, M.C. **Desenvolvimento ontogênico do rim, timo e baço e expressão fenotípica dos receptores CD3 e CD4 em linfócitos do bijupirá *Rachycentron canadum***. 2012. 65f. Dissertação 9Mestrado em Aquicultura) - Programa. Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2012.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas Colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001, p.1465.

KUBITZA, F. Questões frequentes dos produtores sobre a qualidade dos alevinos de Tilápia, **Panorama da Aquicultura**. v. 16, p. 14-23. 2006.

KUBITZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 21, p. 10-19, 2011.

Kubitza, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2ª. Edição Revisada e Ampliada, 2011, p. 316.

LEVINE, R.L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods. Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LEVINE, R.L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346-357, 1994.

LI, E. et al. Growth, Body Fatty Acid Composition, Immune Response, and Resistance to *Streptococcus iniae* of Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, Fed Diets Containing Various Levels of Linoleic and Linolenic Acids. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, p. 42-55, 2013.

LIMA, R.K. et al. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1777-1781, 2009.

LOVE, D.C. et al. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 7232-7240, 2011.

LOWENSTEIN, C.J. et al. Nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. **Circulation**, v. 97, p. 1837-1843, 1996.

MALACHY, N.O. et al. Alteration in DNA structure, molecular responses and Na⁺-K⁺-ATPase activities in the gill of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in response to sub-lethal verapamil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 147, p. 809–816, 2018.

MACHADO, T.M. et al. Fatores que afetam a qualidade do pescado na pesca artesanal de municípios da costa sul de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, p. 213-223, 2010.

MARLETTA, M.A. et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, p. 8706- 8711, 1988.

MARTIN, J.G.P. et al. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina Microbiologia**, v. 45, p. 93-98, 2013.

MARTINS, C.V.B. et al. Avaliação da piscicultura na região oeste do estado do Paraná. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, p. 77-84, 2001.

MARTINS, M.L. et al. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Fish Physiol Biochem**, v. 35, p. 219-222, 2009.

MARTINS, A.T. **Efeito de dieta suplementada com selênio em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas a atrazina**. 2016. 44 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) - Pós-graduação em Biodiversidade Animal. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

Mc ELROY, A.E. et al. Spatial patterns in markers of contaminant exposure, glucose and glycogen metabolism, and immunological response in juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 14, p. 53-65, 2015.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E., A. Glutathione. **Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

METWALLY, A.M. Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. **Pharmacognosy, Journal**, v. 3, p. 89-104, 2011.

MIAN, G.F. **Concentração inibitória mínima de antibióticos usadas em aquicultura frente as *Aeromonas* moveis**. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade federal de Lavras, Lavras, 2006.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 5, p. 62–71, 2001.

MOCK, A.; PETERS, G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport, and water pollution. **Journal of Fish Biology**, v. 37, p. 873-885, 1990

MOREIRA, A.B. et al. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian brycon freshwater fishes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 565-574, 2001.

MOORE, J.E. et al. High diversity of bacterial pathogens and antibiotic resistance in salmonid fish farm pond water as determined by molecular identification employing 16S rDNA PCR, gene sequencing and total antibiotic susceptibility techniques. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 108, p. 281-286, 2014.

MULYANINGSIH, S. et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytotherapy**, v. 17, p. 1061-1066, 2010.

NATHAN, C.; HIBBS, J.B.Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion Immunology**, v. 3, p. 65-70, 1991.

NAVARRO, R.D. et al. Desempenho de Tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementada com vitamina C. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 589-596, 2010.

NAIR, R.; CHANDA, S. *In-vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* l. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 452-458, 2007.

NEDOLUHA, P.C., WESTHOFF, A. Microbiological flora of aquacultured hybrid striped bass. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 1054-1060, 1993.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NYA, E.J.; DAWOOD, Z.; AUSTIN, B. The garlic component, allicin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 33, p. 293-300, 2010.

NOGA, E.J. **Fish Disease: Diagnosis and Treatment**. Mosby. Missouri: Ed. ST. Louis. p. 139-162. 1996.

OBINNA, C.N.; NWODOS, S.C.; OLAYINKA, O. A. Evaluation of antibacterial of *Psidium guajava* and *Gongronema latifolium*. **Journal of Medicinal Plants Resench**, v.v2, p. 189-192, 2008.

OLIVEIRA, E.G. DE. et al. Concentração de glicogênio em diferentes tecidos de pacu (*Piaractusmesopotamicus*), Holmberg, 1887. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 24, p. 89-95, 1997.

OLIVEIRA, D.D.L.; FERREIRA, E.P.D.S.; PORTO, W.S. Mensuração e evidenciação do ativo biológico na piscicultura: uma proposta de fluxo contábil à luz do CPC 29. **Revista Eletrônica Saber Contábil**, v. 2, p. 39-53, 2012.

OSSERMAN, E.F.; LAWLOR, D.P. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytes and monomyelocytic leukemia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 124, p. 921-952, 1966.

OZAKTAS, T.; TASKIN, B.; GOZEN, A.G. High level multiple antibiotic resistance among fish surface associated bacterial populations in non-aquaculture freshwater environment. **Water Research**, v. 46, p. 6382-6390, 2012.

PACHANAWAN, A; PHUMKHACHORN, P.; RATTANACHAIKUNSOPON, P. Potential of *Psidium guajava* Supplemented Fish Diets in Controlling *Aeromonas hydrophila* Infection in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, p. 419–424. 2008.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PALLAMIN, R. **Anestesia e toxicidade aguda do eugenol aplicado em juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen***. 2014. 1-25 f. Relatório de estágio, apresentado ao Departamento de Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias como requisito parcial à obtenção do título de (Engenheiro de Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina), Florianópolis, SC, 2014.

PAULSEN, S.M. et al. *In vivo* effects of b-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 14, p. 39-54, 2003.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2.ed. Maringá: Eduem, 2002, p.305.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Maringá: Eduem, 2008. P.311.

PAGLIOSA, C.M. et al. Methlxanthines, phenolic composition, and antioxidante acticity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) **Food Chemistry, Barking**, v. 122, p. 173-178, 2010.

PEREIRA, D.F. et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, p. 868-877, 2012.

PEREIRA, B.L.C. et al. Influence of Chemical Composition of *Eucalyptus* Wood on Gravimetric Yield and Charcoal Properties. **BioResources, Raleigh**, v. 8, n. 3, p. 4574-4592, 2013.

PINER, P.; UNERB, N. Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosadin the liver of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 36, p. 956–963, 2013.

POZZO, M.D. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp.* isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, p. 667-672, 2011.

QUEIROZ, S.A. et al. Selection indices for a dual purpose breed caracu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 827-837, 2005.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.) **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. p. 89-120.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; LUQUE, J. L. Parasitological and hematological analysis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 from Guarapiranga reservoir, São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum: biological sciences**, v. 27, p. 231-237, 2005.

RANZANI-PAIVA, M., J., T. et al. **Métodos Para Análise Hematológica Em Peixes**. Maringá: Eduem, 2013, 135 p.

RESENDE, E.K. et al. Melhoramento animal no brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: **Simpósio brasileiro de melhoramento animal- SBMA**, v. 8, Maringá, 2010, 11 p.

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 133-149, 2005.

RODGERS, C.J.; FURONES, M.D. Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. In: RODGERS, C.J., BASURCO, B. **The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture**. (eds). Zaragoza, Spain: CIHEAM, 2009, p. 41–59.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

R, CORE, TEAM, (2018). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. URL <https://www.R-project.org/>.

SAHU, S. et al. Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 109-118, 2007.

SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1374-1378, 2005.

SANTOS, D. **Estudo hematológico de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede**. VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, Urbanova-São José dos campos, SP, p. 168-170, 2006.

SANTOS, E.L. et al. Desempenho de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com folha de mandioca desidratada na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 1421-1428, 2015.

SCHUBERT, A. et al. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* (erva-mate). **Química Nova**, v. 29, p. 1233-1236, 2006.

SECOMBES, C.J. The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. London: Academic Press, 1996. 63-105.

SEIXAS-FILHO, J.T. Uma revisão sobre o papel do carboidrato e da proteína no metabolismo de peixes com hábitos alimentar carnívoro e onívoro. **Revista Augustus**, v. 9, p. 32-51, 2004.

SHAO, J.; XIANG, L. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes *in vitro*. **Aquaculture**, v. 229, p. 11-23, 2004.

SILVA, W.E. **Ação da melatonina exógena na cirrose hepática experimental e seus efeitos sobre o rim e baço de ratos albinos**. 2017. 156 f. Tese (Doutor em Biociência Animal: Área de Morfofisiologia) - Curso de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

- SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: **Da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre: Editora da UGRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010, p.1104.
- SRIVASTAVA, A. et al. Molecular and functional analysis of scalloped recessive lethal alleles in *drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 166, p. 183-1843, 2004.
- SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; LIM, C. Immunity and Disease Resistance in Fish. In: LIM, C.; WEBSTER, C., D. **Nutrition and fish health**. New York: Food Products Press, 2001, p. 149.
- SCHROEDERS, V. et al. Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 288, p.184-189, 2009.
- SPARLING, D.W.; et al. Blood changes in mallards exposed to white phosphorus. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 2521-2539, 1998.
- STAFFORD, J.L.; et al. A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 685–698, 2003.
- SVEINBJORNSSON, B., OLSEN, R.; PAULSEN, S. Immuno cyto chemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 19, p. 349–355, 1996.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil Protozoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 67-79, 2001.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: El autor, 2004, 144 p.
- TAVARES-DIAS, M. et al. **Tópicos especiais em saúde e produção animal**, São Carlos: Pedro e João Editores, 2009, p. 43-80.
- TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M. Effects of stress tests on larvae of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758). **Advances in Environmental Biology**, v. 6, p. 1909-1915, 2012.
- TELLEZ-BAÑUELOS, M.C. et al. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. **Fish Shellfish Immunology**, v. 27, p. 105-111, 2009.
- THRALL, M.A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: GUANABARA Koogan, 2015.p. 529-537.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Rocca, 2008, p. 223-246.

THOMAS, W.; MOON, G.; FOSTER, D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. Hochachka and Mommsen (eds.), **Biochemistry and molecular biology of fishes**, v. 4, p.65-100, 1995.

TORT, L.; BALASCH, J.C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Revista Immunológica**, v. 22, p. 277-286, 2003.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C., F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 171-193, 2004.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VIDAL, L.V.O. et al. Apparent digestibility of soybean coproducts in extruded diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 1–8, 2015.

YANONG, R.P.E.; FLOYD, R.F. **Streptococcal infections of fish**. The institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS) document, University of Florida, USA, 2006.

ZAPATA, A.A.; CHIBA, A., VARAS, A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In: IWAMA, G.K.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. Organism pathogen and environment. Academic Press Vancouver, v. 35, p.1-62, 1996.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: EURICO, M.; et al., (Eds), **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, São Paulo: TecArt, Cap. 9, p. 239-266, 2004.

WRIGHT, G.D. The antibiotic resistance. **Expert Opin Drug Disc.**, v. 5, p. 779–788, 2010.

WILLIAM. O., R.; SWANSON, M., J. Capítulo 3: Composição e Função do Sangue, p. 24. In: DUKES et al., **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006.

WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. Infectious hematopoietic necrosis virus. **Fish disease and Disorders**, v. 3, p. 626 – 633, 1998.

8. ANEXO I

TABELAS

Tabela 8. Atividade das enzimas AST em U. L⁻¹, e ALT em U. L⁻¹ no plasma de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate

| | AST | ALT |
|--|----------------|---------------|
| Não desafiados | | |
| C | 114,03 ± 31,17 | 91,37 ± 14,28 |
| T1 | 103,58 ± 31,71 | 50,95 ± 12,31 |
| T2 | 97,56 ± 29,12 | 55,28 ± 11,08 |
| T3 | 126,85 ± 25,91 | 56,40 ± 10,64 |
| T4 | 94,60 ± 29,41 | 48,96 ± 17,47 |
| Desafiados com <i>A. hydrophila</i> | | |
| C BAC | 96,72 ± 10,17 | 55,60 ± 11,58 |
| T1 | 115,39 ± 6,89 | 55,11 ± 18,10 |
| T2 | 105,59 ± 12,55 | ----- |
| T3 | 108,38 ± 32,47 | 63,37 ± 13,22 |
| T4 | 108,88 ± 20,48 | 59,76 ± 20,35 |

C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3, com 0,5 % extrato de erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate). BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. ---- Grupo sem amostras para a realização da dosagem. Os valores são expressos como média ± DP; n=20 para cada tratamento.

Tabela 9. Glicemia em mg. dL⁻¹ e reserva de Glicogênio em mg de glicogênio. g de tecido hepático⁻¹ de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate.

| | Glicemia | Glicogênio |
|--|----------------|-------------|
| Não desafiados | | |
| C | 76,26 ± 13,15 | 3,12 ± 1,47 |
| T1 | 55,74 ± 7,18* | 2,87 ± 0,86 |
| T2 | 66,88 ± 8,70 | 4,10 ± 1,13 |
| T3 | 90,88 ± 8,08 | 3,82 ± 2,34 |
| T4 | 62,08 ± 8,25 | 2,06 ± 1,12 |
| Desafiados com <i>A. hydrophila</i> | | |
| C BAC | 79,04 ± 10,39 | 4,32 ± 1,82 |
| T1 | 86,46 ± 13,01 | 6,43 ± 1,50 |
| T2 | 83,02 ± 12,70# | 7,13 ± 2,43 |

| | | |
|----|---------------|-------------|
| T3 | 75,51 ± 4,51# | 4,02 ± 1,37 |
| T4 | 73,49 ± 16,35 | 5,26 ± 1,82 |

C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3, com 0,5 % extrato de erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate). BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média ± DP; n=20 para cada tratamento. * estatisticamente diferente do controle, # estatisticamente diferente da respectiva concentração não desafiada.

Tabela 10. Concentração de glutathiona reduzida total -GSH, em mM. mL⁻¹ no fígado de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate.

| GSH | |
|-------------------------------------|---------------|
| Não desafiados | |
| CONTROLE | 9,75 ± 2,60 |
| T1 | 10,55 ± 3,23 |
| T2 | 11,75 ± 6,36* |
| T3 | 9,44 ± 4,06 |
| T4 | 8,44 ± 3,04 |
| Desafiados com <i>A. hydrophila</i> | |
| CONTROLE BAC | 6,29 ± 0,95 |
| T1 | 8,92 ± 1,83 |
| T2 | 10,90 ± 1,78 |
| T3 | 10,77 ± 2,63 |
| T4 | 8,84 ± 2,34 |

C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3, com 0,5 % extrato de erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate). BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média ± DP; n=20 para cada tratamento, * estatisticamente diferente do controle.

Tabela 11 Atividades das enzimas Glutathiona S-Transferase (GST) em mM⁻¹.min⁻¹.mg proteína⁻¹ e Catalase (CAT) (mmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹) no fígado de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate.

| | GST | CAT |
|-------------------------------------|-------------|-------------|
| Não desafiados | | |
| C | 1,79 ± 1,05 | 0,09 ± 0,05 |
| T1 | 1,27 ± 0,49 | 0,07 ± 0,01 |
| T2 | 0,86 ± 0,42 | 0,09 ± 0,05 |
| T3 | 1,28 ± 1,06 | 0,09 ± 0,01 |
| T4 | 1,63 ± 1,58 | 0,09 ± 0,01 |
| Desafiados com <i>A. hydrophila</i> | | |
| C BAC | 0,52 ± 0,12 | 0,11 ± 0,09 |
| T1 | 1,40 ± 1,28 | 0,15 ± 0,07 |
| T2 | 0,74 ± 0,36 | 0,09 ± 0,03 |
| T3 | 1,03 ± 0,28 | 0,06 ± 0,01 |

T4 $1,27 \pm 1,68$ $0,09 \pm 0,01$

C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3, com 0,5 % extrato de erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate). BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; n=20 para cada tratamento.

Tabela 12. Proteína Carbonilada -PC (μmol^{-1} . mg de proteína⁻¹) e Lipoperoxidação -LPO (mmol TBARS⁻¹.mg proteína⁻¹) no fígado de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate.

| | PC | LPO |
|--|-----------------|-----------------|
| Não desafiados | | |
| C | $4,97 \pm 1,44$ | $2,37 \pm 0,98$ |
| T1 | $4,35 \pm 2,94$ | $2,83 \pm 0,64$ |
| T2 | $4,48 \pm 1,55$ | $2,97 \pm 0,80$ |
| T3 | $1,94 \pm 1,19$ | $2,94 \pm 0,70$ |
| T4 | $2,77 \pm 1,46$ | $2,90 \pm 0,99$ |
| Desafiados com <i>A. hydrophila</i> | | |
| C BAC | $2,16 \pm 1,56$ | $2,44 \pm 0,77$ |
| T1 | $1,17 \pm 0,72$ | $2,74 \pm 1,27$ |
| T2 | $2,49 \pm 1,50$ | $2,79 \pm 1,04$ |
| T3 | $3,22 \pm 1,10$ | $2,84 \pm 0,64$ |
| T4 | $1,73 \pm 1,96$ | $2,56 \pm 0,89$ |

C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3, com 0,5 % extrato de Erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate). BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; n=20 para cada tratamento.

Tabela 13. Concentração de Nitrito/Nitrato em μM no rim de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate.

| Nitrito/Nitrato | |
|--|-------------------|
| Não desafiados | |
| C | $3,50 \pm 1,47$ |
| T1 | $5,59 \pm 1,81^*$ |
| T2 | $3,88 \pm 1,33^*$ |
| T3 | $2,85 \pm 0,56$ |
| T4 | $3,42 \pm 1,27$ |
| Desafiados com <i>A. hydrophila</i> | |
| C BAC | $3,01 \pm 0,76$ |
| T1 | $3,97 \pm 1,43$ |
| T2 | $4,33 \pm 1,36$ |
| T3 | $2,87 \pm 0,88$ |

T4 $3,99 \pm 1,91$

C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3, com 0,5 % extrato de erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate). BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. Os valores são expressos como média \pm DP; n=20 para cada tratamento. *Estatisticamente diferente do controle.

Tabela 14. Atividade da enzima Lisozima plasmática em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e atividade da enzima Lisozima renal em $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de *O. niloticus* suplementada com diferentes concentrações de extrato de erva-mate.

| | Atividade da Lisozima Renal | Atividade da Lisozima Plasmática |
|--|-----------------------------|----------------------------------|
| Não desafiados | | |
| C | $0,032 \pm 0,007$ | $0,111 \pm 0,034$ |
| T1 | $0,037 \pm 0,001$ | $0,084 \pm 0,027$ |
| T2 | $0,034 \pm 0,003$ | $0,090 \pm 0,029$ |
| T3 | $0,031 \pm 0,009$ | $0,107 \pm 0,001$ |
| T4 | $0,033 \pm 0,007$ | $0,089 \pm 0,024$ |
| Desafiados com <i>A. hydrophila</i> | | |
| C BAC | $0,036 \pm 0,001$ | $0,119 \pm 0,021$ |
| T1 BAC | $0,031 \pm 0,012$ | $0,127 \pm 0,035$ |
| T2 BAC | ----- | $0,130 \pm 0,019$ |
| T3 BAC | $0,035 \pm 0,003$ | $0,142 \pm 0,015$ |
| T4 BAC | $0,036 \pm 0,003$ | $0,073 \pm 0,025$ |

C (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,005% extrato de erva-mate); T2 (Tratamento 2, com 0,05% extrato de erva-mate). T3 (Tratamento 3, com 0,5 % extrato de erva-mate); T4 (Tratamento 4, com 5 % extrato de erva-mate). BAC – grupos experimentais desafiados com *A. hydrophila*. --- Grupo sem amostras para a realização da dosagem. Os valores são expressos como média \pm DP; n=20 para cada tratamento.